
Mastergradsoppgave i Molekylær biovitenskap
studieretning molekylærbiologi

**Studier av reseptorer for C3a og C5a på
humane T-lymfocytter**

Kristine Sponheim

Omfang: 60 studiepoeng

Institutt for molekylær biovitenskap
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO Våren 2008



FORORD

Det praktiske arbeidet presentert i denne oppgaven ble utført ved Immunologisk institutt, Rikshospitalet, Universitetet i Oslo, under veiledning av Professor Tor Lea.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til min veileder, Professor Tor Lea, for all hjelp i det praktiske arbeidet, samt under skriveprosessen. Ditt engasjement og din kunnskap er en stor inspirasjon.

En spesiell takk går også til Charlotte Ramstad Kleiveland for hjelp til det praktiske arbeidet, samt all hjelp under skriving av oppgaven. Din kunnskap er imponerende. Hva skulle jeg gjort uten deg!

Jeg vil også takke Ellen Karlstrøm for tålmodighet og tilstedeværelse, samt en liten takk til jentene på IMMI. Dere har gjort tiden på labben til en uforglemmelig periode med oppmuntring og latter ved benken. Takk til Linn Kristin Akslen for oppmuntring, hjelp og gjennomlesing av oppgaven, og takk til Tine Weise Abrahamsen for all støtte og oppmuntring når det buttet i mot. Jeg vil også takke jentene på Biologisk Institutt; "Alle i land!". Alle gode medstudenter; studietiden har vært fantastisk takket være dere!

En spesiell takk går også til min søster, og tidligere medstudent, Marianne Sponheim. Du er uvurderlig og har vært en stor støtte og hjelp under hele studietiden. "Tight junctions" vil aldri bli det samme!

En stor takk sendes også til mine foreldre, Marit og Lars Sponheim. Takk for all støtte, oppmuntring og engasjement til mine studier. Og ikke minst, takk for at dere holdt ut denne siste tiden med en stresset Kristine. Bård, takk for at du var der med et smil.

En siste takk til Martin; takk for all støtte og tålmodighet.

Februar 2008
Kristine Sponheim

SAMMENDRAG

Det går et fint skille mellom medfødt og ervervet immunitet og de to systemene samarbeider på mange områder. Anafylatoksinene C3a og C5a er viktige effektormolekyler som produseres av det medfødte immunforsvaret. De påvirker en rekke inflammatoriske responser ved å binde til sine respektive reseptorer, C3aR og C5aR. Forekomst av funksjonelle anafylatoksinreseptorer på T-lymfocytter vil være et nyttig eksempel på dette samarbeidet mellom medfødt og ervervet immunitet. Disse studiene omhandler påvisning og en innledende karakterisering av funksjonelle egenskaper til anafylatoksinreseptorer på humane T-lymfocytter.

Innledningsvis ble mRNA for C3aR og C5aR, men ikke C5L2, påvist i humane T-lymfocytter ved hjelp av RT-PCR. Væskestrømcytometrianalyser ga derimot ikke holdepunkter for at reseptorene var uttrykt på overflaten av T-cellene. Det ble derfor gjennomført forsøk i funksjonelle testsystemer. Resultater fra disse studiene dokumenterer at C5a påvirker T-celleproliferasjonen, samt regulerer frigjøring av enkelte cytokiner. Westernblotanalyser viser dessuten at C5a-stimulering øker ERK-fosforylering i T-lymfocytter. C5a påvirker derimot ikke den stressaktiverende MAP-kinasen JNK/SAPK eller cellenes I κ B- α nivåer.

Disse resultatene indikerer derfor tilstedeværelse av en funksjonell C5aR i T-cellemembranen. Dette kan bidra til rekruttering av T-celler ved aktivering av inflammatoriske responser og til regulering av T-lymfocyttenes cytokinproduksjonsmønster.

INNHALDFORTEGNELSE

FORORD.....	2
SAMMENDRAG.....	3
FORKORTELSER.....	6
1 INNLEDNING	8
1.1 Immunsystemet.....	8
1.1.1 Medfødt immunitet.....	8
1.1.2 Adaptiv immunitet.....	10
1.2 T-celleaktivering.....	11
1.2.1 T-celleaktivering <i>in vivo</i>	11
1.2.2 T-celleaktivering <i>in vitro</i>	13
1.3 Intracellulære signalveier i T-celler.....	13
1.3.1 Overflatereseptorer.....	14
1.3.2 Mitogenaktivert protein (MAP) kinase signalveier.....	14
1.3.3 IκB kinaser: Nøkkeregulator av NF-κB- signalveien.....	16
1.4 Anafylatoksinene: C5a og C3a.....	17
1.4.1 C5a og C3a.....	18
1.4.2 C5aR og C3aR.....	19
1.4.3 C5L2.....	20
1.5 Mål med oppgaven.....	21
2 MATERIALER.....	22
2.1 Laboratorieutstyr og instrumenter.....	22
2.2 Oppskrifter.....	23
2.2.1 Cellekultur arbeid.....	23
2.2.2 SDS-PAGE og Westernanalyse.....	23
2.2.3 Væskestrømscytometri.....	25
2.3 Kjemikalier.....	26
2.4 Kit.....	26
2.5 Medier og løsninger	26
2.6 Proteiner/Antistoffer/Aktivatører.....	27
2.6.1 RT-PCR.....	27
2.6.2 Antistoffreagenser.....	27
3 METODER.....	28
3.1 Cellearbeid.....	28

3.1.1	Celledyrking- og splitting av Jurkat E6.1.....	28
3.1.2	Celletelling.....	28
3.1.3	Frysing av celler.....	29
3.1.4	Tining av celler fra nitrogentank.....	29
3.1.5	T-celle stimulering.....	30
3.1.6	Isolering av mononukleære celler (MNC) fra perifert blod.....	30
3.1.7	Isolering av T-celler på nylonsøyle.....	31
3.1.8	Granulocyt isolering.....	31
3.1.9	Viabilitetstest.....	32
3.2	Real time RT-PCR.....	32
3.3	Væskestrømscytometri.....	33
3.4	Separering og detektering av proteiner.....	34
3.4.1	Stimulering, lysing og prøve opparbeidelse av celler for kjøring på dodecylsulfat polyacrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE).....	34
3.4.2	SDS-PAGE.....	35
3.4.3	Westernblotting.....	35
3.5	In vitro celleproliferasjonsassay.....	37
3.6	Cytokinanalyse.....	39
4	RESULTATER.....	40
4.1	RT-PCR: Påvisning av mRNA for C5aR, C3aR og C5L2 i Jurkat E6.1 og stimulerte T-celler.....	40
4.2	Detektering av C3aR og C5aR ved hjelp av væskestrømscytometri.....	41
4.2.1	Påvisning av C3aR og C5aR på granulocytter.....	41
4.2.2	Detektering av C5aR og C3aR på 24, 48, 72 og 96 timers stimulerte T- celler, farget med anti- CD56- FITC, anti- CD3- FITC og anti- CD3- PE.....	42
4.3	C5a og celleproliferasjon.....	44
4.3.1	Effekten av C5a på proliferasjon av anti-CD3/CD28 stimulerte humane T-celler...44	44
4.3.2	Effekten av anti-C5aR antistoffer på proliferasjon av anti-CD3 stimulerte humane T-celler.....	45
4.3.3	Effekten av C5aR på proliferasjon av hvilende og stimulerte humane T-celler i nærvær av anti-CD3 og KAM-IgG.....	47
4.4	C5a og intracellulære signalveier i T-celler.....	49
4.4.1	Effekten av C5a på tyrosinfosorylering i humane T-celler.....	49
4.4.2	Effekten av C5a på fosorylering av ERK i humane T-celler.....	51
4.4.3	Effekten av C5a på aktiviteten av I κ B- α i humane T-celler.....	52
4.5	C5a og cytokiner i humane T-celler.....	53
5	DISKUSJON.....	55
5.1	Konklusjon og videre arbeid.....	60
6	LITTERATURLISTE.....	62

FORKORTELSER

Forkortelse	Forklaring
AC	Adenylyl cyclase
APC	Antigenpresenterende celle
APS	Ammonium persulfat
ATF	Activating transcriptionfactor (aktiverende transkripsjonsfaktor)
BSA	Bovint serumalbumin
C3aR	Complement 3a receptor (komplement 3a reseptor)
C5aR	Complement 5a receptor (komplement 5a reseptor)
C5L2	Complement 5a like receptor (komplement 5a lignende reseptor)
cAMP	Cyclic (syklisk) adenosinmonofosfat
CD	Cluster of differentiation (Differensieringsantigen)
cDNA	Complimentary deoxyribonucleic acid (komplementær deoksyribonukleinsyre)
CRP	C-reaktivt protein
C _T	Threshold cycle (terskelverdi syklus)
DEPC	Dietyl pyrokabonat
dH ₂ O	Destillert H ₂ O
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoxyribonucleic acid (deoksyribonukleinsyre)
D-PBS	Dulbeccos fosfatbuffrede saltvann
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
ERK	Ekstracellulær signalregulert kinase
FCS	Føtalt kalveserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GADPH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GDP	Guanosindifosfat
Gi	Inhiberende G-protein
GM-CSF	Granulocytt monocytt kolonistimulerende faktor
GPCR	G-proteinkoblede reseptorer
Gs	Stimulerende G-protein
GTP	Guanosintrifosfat
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HLA	Hovedvevsforlikelighetsantigen
HRP	Horseradish peroxidase (pepperrotperoksidase)
HUVEC	Human umbilical cord endothelial cells
Ig	Immunglobulin
IKK	IκB kinase
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-reseptor
INF	Interferon
ITAM	Immunreseptor tyrosinbasert aktiveringsmotiv
IκB	Inhibitor av κB
kDa	Kilodalton
LAT	Linker of activated T-cells
Lck	Leukocyt-spesifik protein tyrosine kinase
LPS	Lipopolysakkarid
MAPK	Mitogenaktivererte proteinkinaser
MAPKK	MAPK kinase

Forkortelse	Forklaring
MAPKKK	MAPK kinase kinase
MASP	mannosebindende lektin (MBL)-assosiert serin protease
MBL	Mannosebindende lektin
MEK	MAP og ERK kinase
Min	Minutter
MNC	Mononukleære celler
NF-κB	Nukleærfaktor κB
NK	Natural killers (naturlige dreperceller)
NP-40	Nonidet P-40
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI-PLC	Fosfoinosidspesifikk fosfolipase C
PLC	Fosfolipase C
PHA	Phytohaemagglutinin
PKA	Protein kinase A
PMA	Forbol myristat acetat
PT	Pertussi toxin
PTK	Proteintyrosinkinase
PVDF	Polyvinyliden difluorid
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted
Rel	Reticuloendotheliosis oncogene
RNA	Ribonucleic acid (ribonukleinsyre)
Rpm	Rounds per minute (runder per minutt)
RTK	Reseptortyrosinkinaser
RT-PCR	Revers transkriptase polymerase kjedereaksjon
SAA	Serum amyloidprotein
SAPK/JNK	Stressaktiverende proteinkinase/ c-Jun N terminalkinase
SDS	Sodium dodecyl sulaphate (natrium dodesylsulfat)
SDS-PAGE	Natrium dodesylsulfat polyacrylamidgelelektroforese
TBS	Tris bufret saltvann
TBS-T	Tris bufret saltvann med tween
Tc	T-celler
TCC	Terminalt komplement kompleks
TCR	T-cellereseptor
TEMED	N, N, N`N`-tetra-metyl etylendiamin
TGF	Tumor growth factor/transforming growth factor (tumor vekstfaktor)
Th1	T-hjelper 1
Th2	T-hjelper 2
TNF	Tumornekrosefaktor
ZAP-70	Zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa

1 INNLEDNING

1.1 *Immunsystemet*

Immunsystemet er bygd opp av et komplekst nettverk av spesialiserte celler, som er organisert i lymfoide vev og organer. Immunsystemet har som hovedoppgave å beskytte kroppen vår mot infeksjoner og patogene mikroorganismer, og gjør dette ved hjelp av cellulære og biokjemisk komponenter. Immunsystemet kan deles inn i to hoveddeler; medfødt og ervervet immunsystem. Medfødt (ikke-adaptiv) immunitet er spesielt viktig i startfasen av en immunrespons og virker kontinuerlig eller svært raskt etter oppstått infeksjon. Denne type immunitet er imidlertid ikke spesifikk og kan ikke skille mellom ulike sykdomsfremkallende mikroorganismer. Ervervet (adaptiv) immunitet derimot, representerer en mer spesialisert immunrespons og reagerer mot strukturer som er karakteristiske for hvert enkelt patogen. Denne spesifisiteten gjør at ervervet immunitet ikke virker like raskt som medfødt immunitet. Samarbeidet mellom disse to systemene danner kroppens immunforsvar.

1.1.1 Medfødt immunitet

Medfødt immunitet omfatter cellyper som monocytter i blod, vevsmakrofager, granulocytter (neutrofiler) og dendritiske celler, som alle har fagocytterende funksjon, samt mastceller og de naturlige drepercellene (NK-celler). Disse cellene representerer første forsvarslinje.

Parallelt med aktivering av cellene i først forsvarslinje vil man også kunne registrere en forandring i konsentrasjon av enkelte plasmaproteiner. Disse plasmaproteinene kalles akutfasereaktanter, og omfatter blant annet C-reaktivt protein (CRP), α_2 -makrogobulin, α_1 -antitrypsin, fibrinogen, mannosebindende lektin (MBL) og serum amyloidprotein (SAA), samt transportproteinene albumin og transferrin. CRP er en viktig faktor i medfødt immunitet og er ofte brukt ved påvisning av infeksjon i kroppen. Proteinene fester seg til overflaten av mikroorganismen og aktiverer på denne måten komplementsystemet.

1.1.1.1 Komplementsystemet

Komplementsystemet er et komplekst nettverk av proteiner som hører til det medfødte immunforsvar. Aktivering av systemet foregår som et kaskadesystem der hvert proteolytiske enzym spalter neste komponent i kaskaden (Monk et al., 2007). De innledende komponentene er såkalte proenzymer som får enzymaktivitet ved spalting. Det vil si at komplementsystemet må aktiveres for å utøve sin funksjon. Dette kan skje på tre forskjellige

måter; klassisk aktiveringsvei, alternativ aktiveringsvei og lektinaktiveringsveien. Disse tre aktiveringsveiene fungerer likt på flere områder, men skiller seg også fra hverandre på enkelte områder.

Alternativ komplementaktivering

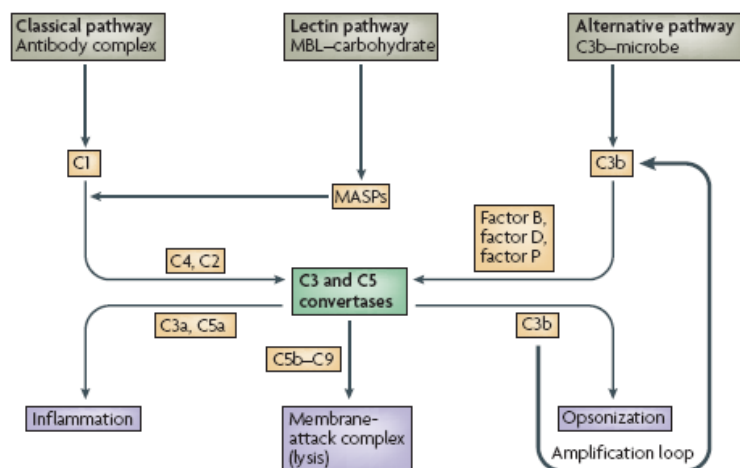
Denne aktiveringsveien starter med en kontinuerlig pågående spontan hydrolyse av komponent C3 til C3(H₂O) (Monk et al., 2007). C3(H₂O) binder deretter faktor B. Et lite fragment (Ba) spaltes av og den resterende delen av komplekset (C3(H₂O)Bb) danner en løselig C3-konvertase. Denne konvertasen har enzymaktivitet og er ansvarlig for å spalte komponent C3 til C3a og C3b. C3a betegnes som et anafylatoksin og har kraftig biologisk effekt. Det andre fragmentet, C3b, binder seg til overflaten av vertceller og patogener, og fungerer som et opsonin, som vil si at det tiltrekker seg fagocytterende celler. C3b kan videre binde faktor B og spalte av Ba. C3b(Bb) danner en membranbundet C3/C5-konvertase. Denne konvertasen kan spalte både komponent C3 og komponent C5. Komponent C5 spaltes til C5a og C5b. C5a er som C3a et anafylatoksin. C5b binder seg til mikroorganismens overflate, noe som resulterer i dannelse av det terminale komplementkomplekset (TCC) og osmotisk cellelysering (Lachmann and Hughesjones, 1984).

Klassisk komplementaktivering

Klassisk aktiveringsvei er en respons på dannelse av immunkomplekser (Monk et al., 2007). Immunkomplekser betegner strukturer med bundet antistoff (Lea, 2006). Faktor C1 vil feste seg til Fc-regionen på disse antistoffmolekylene. Videre aktiveringskaskade resulterer i aktivering av C3-konvertasen. Videre forløp av klassisk komplementaktivering er lik alternativ aktivering (Lachmann and Hughesjones, 1984).

Lektinaktiveringsveien

Denne aktiveringsveien ligner mye på klassisk aktiveringsvei, men uten at antistoffer inngår. Selve prosessen starter med at mannosebindende lektin (MBL), en akutfasereaktant, binder seg til overflaten på mikroorganismen. Dette medfører aktivering av to serin proteaser (MASP1 og MASP2) som videre spalter C2 og C4 slik at C2b og C4b danner C3-konvertase i membranen (Dommett et al., 2006; Ikeda et al., 1987).



Figur 1.1 (Kemper and Atkinson, 2007) Aktivering av komplementsystemet. Figuren viser de tre aktiveringsmønstrene i komplementsystemet: klassisk aktivering, alternativ aktivering og lektin aktivering. Alle tre aktiveringsmønstrene ender i dannelsen av C3 og C5 konvertaser, som igjen ender i inflammasjon (C5a og C3a), dannelsen av terminalt komplementkompleks som medfører cellelysering og opsonisering.

Som forklart over og vist i Figur 1.1, er de tre aktiveringsveiene noe forskjellige. Tre egenskaper går likevel igjen i alle tre systemene; dannelsen av C3/C5-konvertasen som igjen medfører dannelsen av opsoniner (C3b), anafylatoksiner C3a og C5a og det terminale komplementkompleks (TCC).

1.1.2 Ervervet immunitet

Spesialiserte celler, kalT-lymfocytter, representerer den ervervede delen av immunsystemet. Man har to typer lymfocytter, B-lymfocytter og T-lymfocytter, som henholdsvis utvikles i beinmarg og thymus. Modene celler beveger de seg ut i lymfesystemet og blodbanen der de forblir inaktive inntil lymfocytene via sin antigenreseptor binder et antigen (fremmedelement). Denne bindingen kan føre til celledeling og utvikling av effektorceller. Effektorcellene er spesialiserte celler som spesifikt bekjemper fremmede strukturer. Det er i utgangspunktet få lymfocytter til stede i blodbanen og lymfesystemet som kan reagere på den spesifikke mikroorganismen. Det tar derfor tid fra ervervet immunitet aktiverer første effektorcelle til mikroben kan bekjempes effektivt. Ervervet immunitet karakteriseres også av mangfold, hukommelse, selvbegrensning, toleranse og skille mellom selv og ikke-selv.

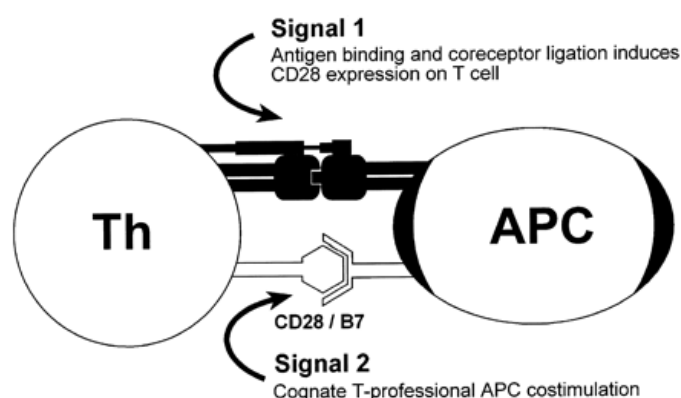
Man kan dele adaptiv immunrespons inn i en humoral og en cellulær del (Golovtchenko and Raichvarg, 1975). Humoral immunrespons er representert ved løselige forbindelser som påvirker immunsystemet. B-celler tilhører den humorale immunresponsen og produserer antistoffer som binder seg til antigenet i løsningsform. Resultatet av bindingen medfører at mikroorganismen merkes for ødeleggelse f.eks gjennom komplementsystemet (opsonisering) (Albert B., 2002). Ved cellulær immunrespons utvikles også effektorceller som

kan angripe mikroorganismene direkte. T-celler tilhører denne delen av immunresponsen og cellene gjenkjenner fragmenterte antigen fremvist på dendrittiske celler (DC), makrofager og B-celler. Disse cellene blir samlet kalt profesjonelle antigenpresenterende celler (APC). Som alle kroppens celler, har disse cellene det man kaller hovedvevsforlikelighetsantigenmolekyler (HLA) på overflaten. Disse binder delvis degradert antigen (Morris et al., 1977). Man har HLA klasse I som presenterer peptider fra proteiner syntetisert inne i cellen (Pamer and Cresswell, 1998; York and Rock, 1996), og man har HLA klasse II som presenterer fragmenterte peptider fra ekstracellulære antigener som er transportert inn i cellen ved endocytose (Harding, 1993).

1.2 T-celleaktivering

1.2.1 T-celleaktivering *in vivo*

Når en T-celle gjenkjenner og binder antigen presentert i et HLA molekyl på en APC, aktiveres T-cellen (Ashwell et al., 1984; Katz et al., 1973). Dette ender blant annet i produksjon av cytokinet interleukin-2 (IL-2) og økt ekspresjon av IL-2 reseptor (IL-2R) (Pfizenmaier et al., 1982). For at denne aktiveringen skal kunne gjennomføres kreves det to signaler (Symington and Teh, 1980). Første signal, signal 1, går gjennom T-cellereseptoren (TCR). Signal 2 sendes som kosignal gjennom CD28/CD86 (Lenschow et al., 1996).

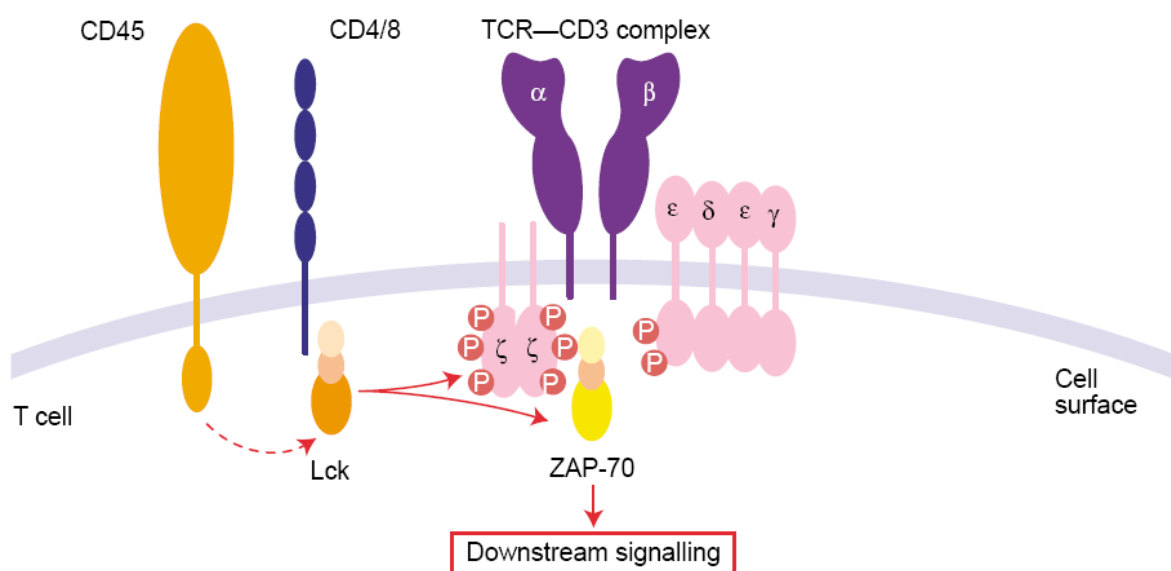


Figur 1.2 (Bluestone et al., 2000) For at T-celler skal kunne produsere IL-2, proliferere og overleve, må cellen aktiveres gjennom to signaler. Signal 1 går gjennom TCR, mens signal 2 signaliserer via kostimulatoriske molekyler som CD28. Uten signal 2 vil cellen dø, eller innta tilstand der cellen ikke deles eller utvikles til effektorcelle (anergi).

TCR står for spesifisiteten ved gjenkjennelse av antigen presentert på APC, men den kan ikke formidle aktiveringssignal inn i cellen alene. Den er avhengig av et kompleks av transmembrane proteiner som assosieres med TCR i membranen (Samelson et al., 1985). Dette komplekset, kalt CD3-komplekset overfører signal 1 fra antigen-HLA-molekylet og videre til intracellulære signalveier (Schwab et al., 1988).

I tillegg til TCR/CD3-komplekset finnes det såkalte kostimulatoriske proteiner i cellemembranen som bidrar til aktiveringseffektiviteten. Mest kjent av disse kostimulatoriske proteinene er CD28. CD28 befinner seg i T-cellemembranen og binder seg til de kostimulatoriske proteinene CD80/86 (B7.1/B7.2) på overflaten til APC (Linsley et al., 1990). Signal 2 sendes via dette CD28-CD80/86 komplekset og inn i T-cellen (Gross et al., 1992).

Flere andre komponenter er også viktig for vellykket T-celleaktivering. CD45 er et kostimulatorisk molekyl, og inneholder to intracytoplasmiske domener med tyrosin fosfataseaktivitet. Disse domenene defosforylerer et tyrosinresiduum på Lck som da aktiveres. Aktivert Lck fosforylerer deretter ITAM (immunreseptor tyrosinbasert aktiveringsmotiv) sekvensen i ζ -kjeden i CD3-komplekset (Dornan et al., 2002). Denne fosforyleringen medfører at en annen proteintyrosinkinase, ZAP-70, binder seg og aktiveres (Chan et al., 1995). Videre medfører dette tyrosin fosforylering av membranproteinet LAT (Linker of Activation of T-cells), som rekrutterer flere proteiner nødvendig for videre signaloverføring inn i cellen (Zhang et al., 1998).



Figur 1.3 (Beverley Wilkinson, 2005) Figuren viser tidlig stadium av T-celleaktivering med TCR/CD3-komplekset og CD4/CD8-Lck og CD45. CD45 opprettholder Lck-aktivering. Ligering av TCR/CD3-komplekset og CD4/CD8-Lck medfører fosforylering av ITAM-sekvensene på CD3. Dette aktiverer tyrosinkinase ZAP-70, som regulerer videre nedstrøms signalveier.

To andre koreseptorer er tett koblet til antigenreseptorkomplekset og bidrar tidlig i aktiveringsprosessen. Disse koreseptorene kalles CD4 og CD8 og er assosiert med proteintyrosinkinase Lck. CD4⁺ T-celler gjenkjenner kun antigen sammen med HLA klasse II-molekyler og utvikler seg til T-hjelperceller (Albert B., 2002). CD8⁺ T-celler gjenkjenner kun antigen sammen med HLA klasse I-molekyler og utvikler seg til T-dreperceller (Albert B., 2002).

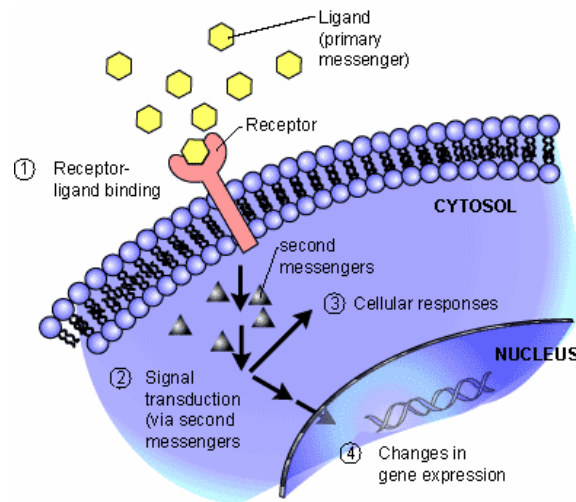
IL-2 er et cytokin som er viktig for proliferasjon og utvikling av T-celler (Taniguchi and Minami, 1993). IL-2 binder til IL-2 reseptor som både er en lav- og høyaffinitetsreseptor og tilhører hematopoietinreseptorfamilien. Lavaffinitetsreseptoren består av en β - og γ -kjede som er konstitutivt uttrykt i membranen (Taniguchi and Minami, 1993). Høyaffinitetsreseptoren består av tre polypeptidkjeder, en α -kjede i tillegg til β - og γ -kjedene (Taniguchi and Minami, 1993). Signal 1 gjennom TCR/CD3-komplekset medfører ekspresjon av den tredje polypeptidkjeden, α -kjeden, til IL-2R i membranen. Signal 2 medfører syntese og utskillelse av IL-2 (Taniguchi and Minami, 1993). IL-2/IL-2R binding påvirker cellene til å utvikles til effektorceller (Fung et al., 2003). Det er også vist at cytokinet motvirker apoptose i T-celler (Nieto et al., 1990).

1.2.2 T-celleaktivering *in vitro*

Som forklart over aktiveres T-celler via TCR/CD3-komplekset i samarbeid med kostimulatoriske molekyler. Denne signaloverføringen er avhengig av tilstedeværelsen av en APC. Ved *in vitro* T-celleaktivering når APC ikke er tilstede må man erstatte den antigenpresenterende cellen ved å tilsette anti-CD3 antistoffer alene eller i kombinasjon med anti-CD28 manuelt. Anti-CD3 og anti-CD28 antistoffene vil binde seg til henholdsvis CD3 på antigenreseptorkomplekset og til det kostimulatoriske CD28-molekylet på T-celler.

1.3 Intracellulære signalveier i T-celler

Binding av ligand til sin respektive reseptor medfører intracellulær signaloverføring via enzymer eller andre signalelementer som er direkte eller indirekte bundet til overflatereseptoren (Albert B., 2002). Signalelementene vil utløse en intracellulær signalkaskade der nye signaler påvirkes og sender signal videre til andre steder i cellen (Secko, 2003).



Figur 1.4 (Secko, 2003) Ved binding av ligand til reseptor, vil intracellulære signalelementer aktiveres, og signal sendes videre i en signalkaskade. Signalkaskaden ender i endring i genekspressjon og cellulær respons.

1.3.1 Overflatereseptorer

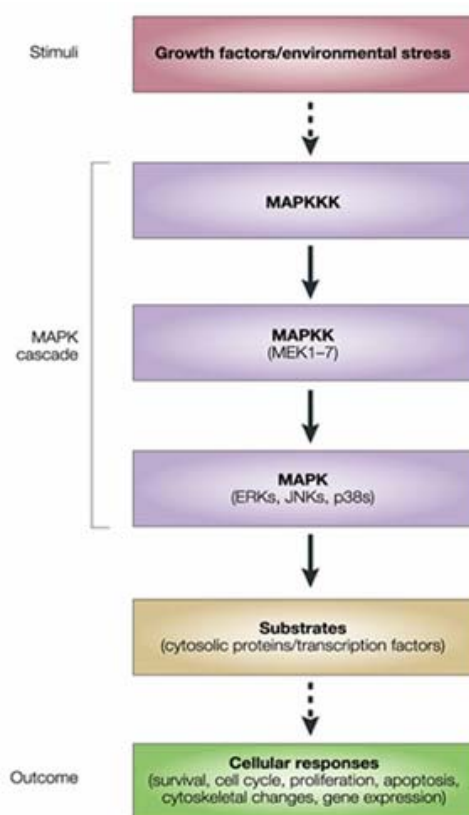
Man har flere typer overflatereseptorer. Den største klassene kalles G-proteinkoblede reseptorer (GPCR) og finnes i alle eukaryoter (Albert B., 2002). Man har tre subfamilier av GPCR; type-A rhodopsinreseptor, type-B calcitoninreseptor og type-C metabotropiskreseptor (Gether and Kobilka, 1998). På cytoplasmatiske side av membranen binder reseptoren til et G-protein. Disse G-proteinene består av en α -, β - og γ -enhet. I ustimulert form har α -enheten bundet GDP. Stimulering av G-proteinet fører til at α -enheten bytter ut bundet GDP med GTP (Berman and Gilman, 1998). Dette igjen medfører en konformasjonsendring av α -enheten som gjør at den dissosierer fra β - og γ -enhetene. Man har nå fått dannet en aktiv α -enhet, samt et aktivt $\beta\gamma$ -kompleks, som begge kan aktivere eller hemme signalveier (Albert B., 2002; Berman and Gilman, 1998). G-proteiner kan deles inn i flere subfamilier. Man har stimulerende G-proteiner (G_s) og inhiberende G-proteiner (G_i) som henholdsvis aktiverer og inhiberer adenylyl cyclase og dermed påvirker cAMP-konsentrasjonen i cellen eller regulerer ionerkanaler (Albert B., 2002).

En annen type overflatereseptor er enzymkoblede reseptorer. Hovedtyngden av enzymkoblede reseptorer har en proteinkinase del, eller er koblet til en proteinkinase. Ligandbinding medfører fosforylering av målproteiner (Albert B., 2002).

1.3.2 Mitogenaktivert protein (MAP) kinase signalveier

MAPK signalveien er en av flere signalveier som oversetter et ytre signal til en nukleær respons (Cobb and Goldsmith, 1995). Den aktiveres raskt etter T-celleaktivering. Selve aktiveringen av MAPK signalveien skjer ved hjelp av en tremodulfosforyleringskaskade initiert av MAPK kinase kinaser (MAPKKK). Disse vil igjen aktivere nedstrøms MAPK kinaser

(MAPKK) ved å fosforylere spesifikke threonin/serin aminosyreresiduer (Widmann et al., 1999). MAPKK vil igjen fosforylere threonin/serin og tyrosin aminosyreresiduer på MAP kinaser. Dette aktiverer MAP kinaser til å formidle signaler nedstrøms gjennom fosforyling av flere proteiner i cellen, som igjen kan påvirke transkripsjonsfaktorer og regulere genuttrykk (Albert B., 2002). MAPK familien inkluderer flere subgrupper som ERK1/ERK2 (Ekstracellulær-Signal Regulert Kinase) og SAPK/JNK (Stressaktiverte proteinkinaser/ c-Jun N-terminal kinase). Alle subgruppene aktiveres via en slik tremodulfosforyleringskaskade, som gir MAPK mulighet til å fosforylere substrater som inkluderer andre proteinkinaser, fosfolipaser og transkripsjonsfaktorer (Chang and Karin, 2001; Johnson and Lapadat, 2002).



Figur 1.5 (Kumar et al., 2003) Figuren viser standard tremodulfosforyleringskaskade for mitogen-aktivert protein (MAP) kinase signalering. Et ytre stimulus (vekstfaktor, stress, samt inflammatoriske cytokiner) påvirker MAPKKK til å fosforylere MAPKK (MEK 1-7), som igjen fosforylerer MAPK. Det finnes flere subfamilier av MAPK (ERK, JNK, p38). Disse vil igjen påvirke cytosoliske proteiner eller transkripsjonsfaktorer som igjen resulterer i cellulær respons.

1.3.2.1 ERK1 og ERK2- signalveien

ERK-signalveien aktiveres av flere faktorer, deriblant vekstfaktorer, cytokiner, ligander for GPCR, ulike typer karsinogener og cellulært stress (stress; ultrafiolett og ioniserende stråling, mekanisk stress eller mangel på oksygen) (Pearson, 2001). Aktiveringen skjer blant annet ved binding av ligand til overflatereseptortyrosinkinaser (RTK) eller GPCR. Dette

medfører fosforylering av GTPasen Ras, og aktivert Ras aktiverer deretter MAPKKK Raf. Raf fosforylerer og aktiverer MAPK-kinasene MEK1 og MEK2 (Franklin et al., 1994). Raf isoformer finnes i relativt lave konsentrasjoner i cytoplasma. MEK finnes derimot i høye konsentrasjoner og er derfor ansvarlig for signalamplifiseringen (Lewin, 2004). MEK fosforylerer og aktiverer MAP-kinasene ERK1 (43kDa) og ERK2 (41kDa). Aktivert ERK translokerer til kjernen der de fosforylerer transkripsjonsfaktorer og regulerer uttrykk av gener som blant annet har innvirkning på celleproliferasjon og differensiering (Johnson and Lapadat, 2002; Pearson, 2001). Det er i tillegg vist at ERK kan inhibere sin egen aktivitet (Brondello et al., 1999). Man har også sett at signal 1 via TCR i T-celler alene kan gi full ERK-fosforylering (Su et al., 1994), ERK-fosforylering medfører økt IL-2 produksjon og økt proliferasjon (DeSilva et al., 1998). ERK påvirker også T-cellers evne til å produsere proinflammatoriske cytokiner som IFN- γ , GM-CSF (Granulocyt monocytt kolonistimulerende faktor) og IL-3 (Egerton et al., 1996).

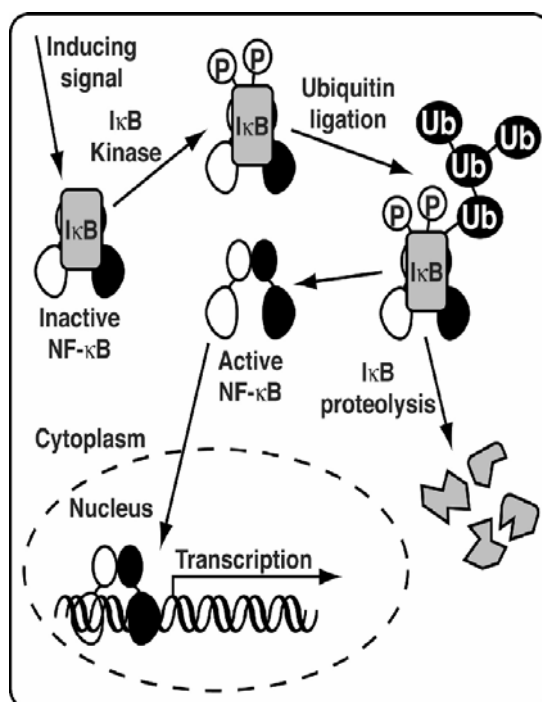
1.3.2.2 SAPK/JNK- signalveien

JNK MAPK signalveien, også kjent som SAPK, er involvert i inflammatoriske responser og responderer på signaler som vekstfaktorer, cytokiner og stress-induserende agenser (Yang et al., 1998). I motsetning til ERK-fosforylering som kun er avhengig av signal 1 fra TCR, krever JNK-aktivering både signal 1 og signal 2 (Su et al., 1994). JNK-signalering påvirker cellulære prosesser som proliferasjon og differensiering (Karin and Hunter, 1995) og medfører IL-2 sekresjon og proliferasjon i thymocytter. I tillegg aktiveres JNK under differensieringsprosessen, der Th1- og Th2-celler dannes. Her virker JNK som en positiv regulator for Th1-utvikling og som en negativ regulator for produksjon av Th2 type cytokiner (Yang et al., 1998). Som med andre MAPK-signalveier, er JNK-signalveien avhengig av flere MAPKKK, som igjen aktiverer MAPK-kinasene MKK4 og MKK7 (Pearson, 2001). Disse vil igjen aktivere JNK, som tilslutt regulerer transkripsjonsfaktorene c-Jun og ATF2 (Karin and Hunter, 1995; Su and Karin, 1996).

1.3.3 I κ B kinaser: Nøkkeregulator av NF- κ B- signalveien

Nukleær faktor (NF)- κ B er en transkripsjonsfaktor som er med på å regulere en rekke immun- og inflammatoriske responser. Den har i tillegg en beskyttende rolle når cellen utsettes for stressfaktorer (Baldwin, 1996). Denne proteinfamilien består av fem medlemmer; RelA, RelB, cRel, NF- κ B1 og NF- κ B2. Disse danner forskjellige homodimerer og heterodimerer som hver aktiverer bestemte sett av gener (Albert B., 2002). I ustimulerte celler befinner NF- κ B seg i cytoplasma, bundet til proteinhemmeren I κ B (Baldwin, 1996). Det er identifisert to typer I κ B, I κ B- α og I κ B- β (Siebenlist et al., 1994). I κ B blir regulert av I κ B-kinaser (IKK) som aktiveres ved hjelp av eksterne stimuli som cytokiner, infeksjoner og

stress (Karin and Delhase, 2000). Aktiverte IKK fosforylerer I κ B. Dette medfører at I κ B dissosierer fra NF- κ B før I κ B ubiquitineres og degraderes. NF- κ B translokerer nå inn i kjernen ved hjelp av en nukleær signalsekvens (Albert B., 2002; Karin and Delhase, 2000). Denne nukleære translokasjonen fører til regulering av flere gener, deriblant IL-1, TNF- α og TNF- β , RANTES (Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted), GM-CSF og IL-6, som alle er proinflammatoriske cytokiner. NF- κ B regulerer også ekspresjon av IFN- β (γ), IL-2 og IL-2R (Siebenlist et al., 1994). Disse øker proliferasjon og differensiering av cellene.



Figur 1.6 (Huxford) Figuren viser hvordan I κ B inaktiverer NF- κ B. Ved stimulering av cellen (eksterne stimuli; stress, infeksjoner og cytokiner) vil I κ B kinase (IKK) fosforylere I κ B, noe som medfører at I κ B slipper NF- κ B løs. I κ B ubiquitineres og sendes til proteasomer for degradering, mens NF- κ B translokeres inn i kjernen der den regulerer genuttrykk.

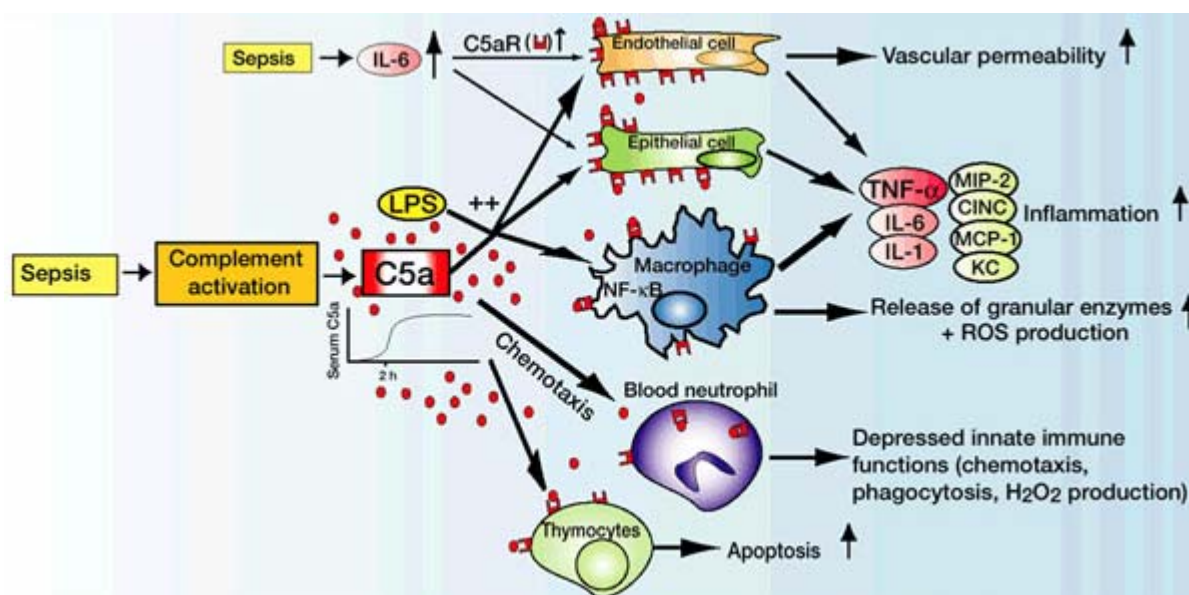
1.4 Anafylatoksinene: C5a og C3a

Komplementanafylatoksinene C3a og C5a ansees som endeproduktene i komplementaktivering. De har kraftig biologisk effekt og resulterer i en rekke inflammatoriske responser (Hawlich et al., 2004). Proteinene deler flere biologiske virkninger, for eksempel mastcelledegranulering, kontraksjon av glatt muskulatur, økning i vaskulær permeabilitet og vasodilatasjon (Frank and Fries, 1991). C5a og C3a frigjøres der komplement aktiveres og binder til sine reseptorer, henholdsvis C5a reseptor (C5aR) og C3a reseptor (C3aR) (Kemper and Atkinson, 2007).

1.4.1 C5a og C3a

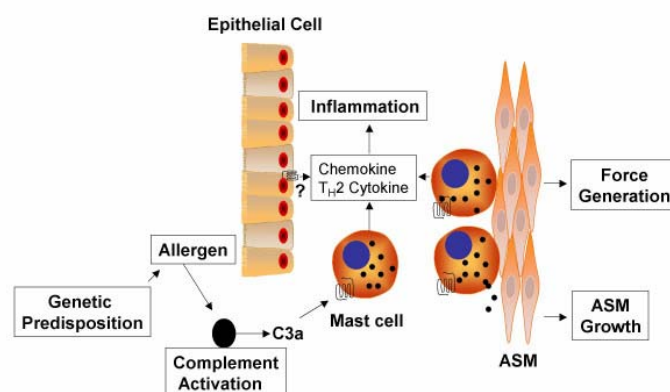
C5a er 12-14,5 kDa stort og består av 74 aminosyrer (Monk et al., 2007). Struktur av C5a i løsning (Zhang et al., 1997; Zuiderweg and Fesik, 1989; Zuiderweg et al., 1989) viser 4 antiparallele α -helixer, som holdes sammen ved hjelp av tre løkke-segmenter, samt stabiliseres av tre disulfidbindinger (Monk et al., 2007).

Første beskrivelse av C5a var som et klassisk anafylatoksin som stimulerte sekresjon av histaminer fra mastceller (Monk et al., 2007). Senere ble C5a identifisert som en kjemoattraktant for mononukleære leukocytter (Snyderman et al., 1971). Det er nå klarlagt at C5a er et pleiotropisk molekyl som påvirker aktiviteten til flere celletyper (Monk et al., 2007). Den påvirker flere biologiske funksjoner inni og utenfor immunsystemet og virker inn på alle celler tilhørende den myeloide cellerekken (Monk et al., 2007).



Figur1.7 (MedscapeToday, 2003) Figuren viser hvordan C5a kan påvirke forskjellige celler og vev ved sepsis. C5a sekresjon påvirker da vaskulær permeabilitet i endotelceller, inflammasjonsrespons i epitelceller, inflammasjonsrespons og utslipp av enzymer fra granula i makrofager, fagocytose ved hjelp av neutrofiler og apoptose ved hjelp av thymocytter.

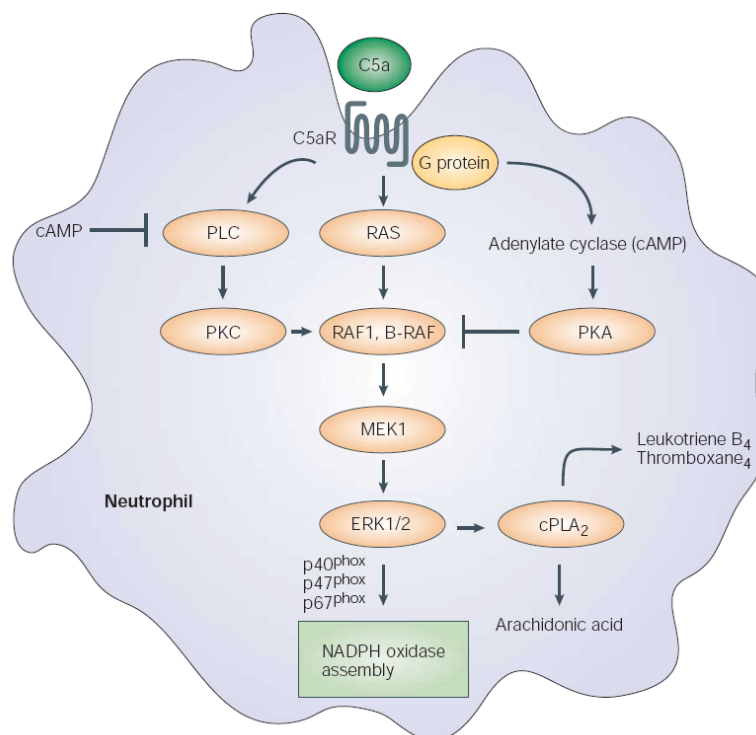
Humant C3a er et protein sammensatt av 77 aminosyrer (Chao et al., 1999). C3a regulerer inflammatoriske reaksjoner ved å binde seg til sin reseptor (Ames et al., 1996; Crass et al., 1996). Dette anafylatoksinet kan i tillegg påvirke mastceller til å produsere kjemokiner og cytokiner som igjen påvirker glatt muskulatur i luftveiene. Noe som resulterer i sykdomstilstanden astma (Ali and Panettieri, 2005).



Figur 1.8 (Ali and Panettieri, 2005) Figuren viser eksempel på C3a funksjon ved astma, der C3a stimulerer sin C3aR på mastceller. Dette påvirker deretter glatt muskulatur i luftveiene og medfører produksjon av kjemokiner og cytokiner som resulterer i inflammasjon.

1.4.2 C5aR og C3aR

C5aR cDNA ble sekvensert for første gang i 1991 (Boulay et al., 1991; Gerard and Gerard, 1991), mens C3aR cDNA ble sekvensert noen år senere av tre uavhengige grupper (Crass et al., 1996; Klos et al., 1992; Roglic et al., 1996). C5aR og C3aR er medlemmer av serpentinreseptorfamilien, der de hører hjemme i peptidreseptorsubfamilien av klasse A rhodopsinlignende reseptorer (Monk et al., 2007; Sayah et al., 2003). C5aR og C3aR er begge koblet til inhibitoriske G-proteiner (Gi) i leukocytter (Norgauer et al., 1993; Rollins et al., 1991). Det er vist at stimulering via C5aR i neutrofiler kan resultere i stimulering av PLC (fosfolipase C). Dette skjer via en Gα16 reseptor (Gq homolog) (Buhl et al., 1995; Jiang et al., 1996). Det er i tillegg vist at aktivering av C5aR i neutrofiler fører til aktivering av MAPK signalveien. Dette skjer via en Gi-protein koblet reseptor (Buhl et al., 1994; Buhl et al., 1995). Senere studier har likevel vist at mutanter av C5aR kan kobles til flere andre typer G-proteiner (Matsumoto et al., 2007).



Figur 1.9 (Ward, 2004) Figuren viser hvordan aktivert C5aR påvirker GPCR aktivering av adenyl cyclase som ender i aktivert PKA. Denne vil igjen inhibere Raf. Aktivering av PKC, derimot, aktiverer Raf som igjen aktiverer MAPK-signalering og ERK-fosforylering i neutrofiler.

Man har lenge ment at C5aR og C3aR uttrykkes på mastceller og den myeloide cellerekke. Både eosinofiler (Kay et al., 1973), basofiler (Hook et al., 1975), neutrofiler, subpopulasjoner av monocytter (Falk and Leonard, 1980) og de fleste vevsmakrofager (McCarthy and Henson, 1979) uttrykker C5aR. Det er senere vist at reseptorene også uttrykkes på ikke-myeloide celler (blant annet i sirkulasjonssystemet, sentralnervesystemet, bindevev, øyet, nyre, lunge og hud) (Monk et al., 2007). Kupfferceller i lever (Laskin and Pilaro, 1986) og mikroglia i sentralnervesystemet (Yao et al., 1990) uttrykker også C5aR. Nyere studier kobler også C5aR til flere biologiske prosesser som påvirker normal organutvikling, tidlig differensiering av ulike cellelinjer og beskyttelse av celler fra apoptose (O'Barr et al., 2001; Schraufstatter et al., 2002; Strey et al., 2003). Studier av C3aR har vist at reseptoren i stor grad finnes uttrykt i de fleste vev, som for eksempel milt, thymus, føtal lever, bukspyttkjertel, pankreas, beinmarg, tynntarm, testikler med flere (Crass et al., 1996).

1.4.3 C5L2

C5L2 (C5a-lignende reseptor 2) genet ble sekvensert i 2000 (Ohno et al., 2000). Reseptoren uttrykkes på forskjellige celler som astrocytter, neutrofiler/makrofager, mastceller, umodne dendritiske celler, samt i vev som hjerne, lunge, hjerte, nyrer, lever, livmor og testikler

(Gavrilyuk et al., 2005; Lee et al., 2001; Ohno et al., 2000; Okinaga et al., 2003; Otto et al., 2004). Flere studier har i tillegg koblet reseptoren opp mot regulering av inflammasjon (Gavrilyuk et al., 2005; Gerard et al., 2005) og sepsis (Gao et al., 2005). C5L2 er i stor grad homolog med C5aR og C3aR (Chen et al., 2007) og er en serpentinreseptor som uttrykkes sammen med C5aR i membranen til flere celletyper (Gerard et al., 2005). Likevel er det fortsatt ikke enighet om reseptoren er G-proteinkoblet (Cain and Monk, 2002; Okinaga et al., 2003). Celler transfektert med C5L2 vil ved stimulering med C5a ikke resultere i økt Ca^{2+} nivå i cellen og aktiverer heller ikke MAPK (Cain and Monk, 2002; Okinaga et al., 2003). Det eksisterer to teorier vedrørende signalering via C5L2 ved C5a-stimulering. Selv om C5L2 i stor grad er homolog med C5aR, er strukturen til C5L2 ulik strukturen til C5aR. Denne strukturforskjellen danner grunnlag for første teori som sier at C5L2 binder C5a uten å videreføre signal inn i cellen. Det blir derfor foreslått at C5L2 har en rolle som "decoy" reseptor og at den regulerer tilgangen på C5a istedenfor å regulere selve signaleringen inn i cellen (Monk et al., 2007). På denne måten vil C5L2 fungerer som en inhibitorisk modulator som forhindrer binding av C5a til C5aR. Dette peker mot en eventuell rolle i et anti-inflammatorisk system (Monk et al., 2007). I neste teori ansees reseptoren likevel som en viktig positiv modulator og virker kooperativt i nedstrøms signalering forårsaket av C5aR (Chen et al., 2007). Fravær av C5L2 påvirker derimot ikke C5a-signalering i den grad fravær av C5aR vil gjøre.

1.5 Mål med oppgaven

Komplementaktivering tilhører medfødt immunitet, og siden anafylatoksinene C5a og C3a produseres i dette systemet, har det lenge vært antatt at disse to proteinene påvirker den medfødte delen av immunforsvaret. Det går derimot et fint skille mellom medfødt og ervervet immunitet, og de senere årene har flere spekulert rundt en mulig påvirkning av anafylatoksinene på ervervet immunitet. Om C5a og C3a påvirker ervervet immunitet, vil det være naturlig å undersøke uttrykk av deres reseptorer, C5aR og C3aR, på T-celler. Det finnes liten informasjon om C5aR eller C3aR uttrykkes på humane T-celler. Werfel et al. publiserte i 2000 bevis for en funksjonell uttrykt C3aR på aktiverte T-celler både *in vitro* og *in vivo* (Werfel et al., 2000). Nataf et al. demonstrerte i 1999 at C5aR uttrykkes på mRNA-nivå i ustimulerte T-celler. De påviste i tillegg små mengder C5aR på proteinnivå, der deres uttrykk ble oppregulert etter PHA stimulering av T-cellene (Nataf et al., 1999). Målet med oppgaven var å se om anafylatoksinene C5a og C3a kan fungere som bindeledd mellom medfødt og ervervet immunsystem ved å undersøke uttrykk av C5aR og C3aR på T-celler. Videre var det ønskelig å bestemme en eventuell funksjonell betydning av aktiverte komplementreseptorer på T-celler.

2 MATERIALER

2.1 Laboratorieutstyr og instrumenter

Teknikk	Utstyr/Instrument	Produsent
Celledyrking	Coulter Z1 (partikkelteller) EasyFlasks™ Nuclon™ Holten Laminair (sterilbenk) Water Jacked Incubator (CO ₂ inkubator)	Coulter Electronics Ltd Nunc AS Heto-Holten AS Forma Scientific
Celleproliferasjonstest	Mikrotiterplate med lokk Filtermate Harvester Glass fiber filters (Easy Tab™) Termaks (50°C inkubatorskap) Top Count NTX™ Top Seal™: 96 well microplates	Corning Incorporated Packard BioScience Packard BioScience KEBOLAB, VWR Packard Bioscience Perker Elmer
Cytokinanalyse	Luminex 100 (Multiplex Bio-Assay Analyzer)	BioRad Laboratories
Mikroskop	Leica DMIL Leitz mikroskop m/ xenon pære	Leica Wetzlar Leica Microskopi AS
RT-PCR	GeneAmp®PCR System 9700 ABI PRISM®7000 Sequence Detection system	Applied Biosystems Applied Biosystems
SDS/PAGE	Mini-PROTEAN® 3 cell Power Pac 300 (strømforsyning)	BioRad Laboratories BioRad Laboratories
Sentrifuger	Biofuge Fresco Biofuge Pico Costar mini sentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Laboratories Heraeus Instruments Costar Heraeus Instruments
Stimulering av celler	Eppendorfrør Thermolyne dri-bath (Varmeblokk) Vannbad	Sarstedt Thermolyne Corporation Grant Instruments
Væskestrømscytometri	FACS Calibur (Væskestrømscytometer) MAC computer med CellQuest™ software program	Becton Dickinson Becton Dickinson
Westernblotting	Hoefer TE77XP Semi- Dry Kromatografipapir (3mm) PVDF- membrane	Hoefer Transfer Unit Whatman Amersham BioSciences

2.2 Oppskrifter

2.2.1 Cellekultur arbeid

RPMI 1640 med 10 % føtalt kalveserum (FCS):

- 5 mL natriumpyruvat løsning
- 5 mL aminosyre 100x (ikke essensiell)
- 25 µL 1M monothioglycerol
- 250 µL garamycin
- 500 mL RPMI med L-glutamin
- 50 mL føtalt kalveserum

Innfrysningsmedium:

- 100 mL RPMI 1640 med 10 % FCS
- 20 mL 20 % dimetylsulfoksid (DMSO)

RPMI 1640 med 1 % FCS:

- 5 mL natriumpyruvat løsning
- 5 mL ikke-essensielle aminosyrer 100x
- 25 µL 1M monothioglycerol
- 250 µL garamycin
- 500 mL RPMI 1640 med L-glutamin
- 5 mL føtalt kalveserum

Viabilitetstest med acridinorange og etidiumbromid:

- 50 mg etidiumbromid (1 mg/mL)
 - 15 mg acridinorange (0,3 mg/mL)
 - 1 mL 96 % etanol
 - 49 mL dH₂O
- (Ved bruk fortynnes stockløsningen 100x med HBSS eller PBS.)

2.2.2 SDS-PAGE og Westernblotanalyse

0,5 M TrisCl, pH 6,8:

- 30,3 g Tris
- 4 N HCl til pH 6.8
- milliQ vann til 500 mL

1,5 M TrisCl, pH 8,8:

- 181,6 g Tris
- 4 N HCl til pH 8,8
- milliQ vann til 1000 mL

10 % APS (ammoniumpersulfat)

- 1,0 g 0,44 M ammoniumpersulfat
- 10 mL milliQ vann

10 % SDS (sodiumdodesylsulfat):

- 10,0 g 0,35 M natriumdodesylsulfat
- 100 mL milliQ vann

Blokkeringsløsning med 30 % BSA (bovine serum albumin):

- 450 mL D-PBS
- 500 µL Tween
- 50 mL 30 % BSA

Blokkeringsløsning med 5 % fettfri tørrmelk:

- 12,5 g fettfri tørrmelk
- 250 mL TBS-T

Elektroforesebuffer:

- 30,2 g 0,025 M Tris
 - 144 g 0,192 M Glysin
 - 10 g 0,1 % SDS
 - 1000 mL milliQ vann
- (Ved bruk: 1 del elektroforesebuffer og 9 deler milliQ vann)

Fosfatasehemmere:

- 0,184 g 1 mM Na_3VO_4 + 10 mL milliQ vann
- 0,084 g 50 mM NaF + 10 mL milliQ vann

Konsentrerende gel, 4 % (SDS-PAGE):

- 335 µL Duracryl (30 %)
- 625 µL Tris-HCl (0,5 M)
- 25 µL 10 % SDS
- 1,5 mL milliQ vann
- 12,5 µL 10 % APS
- 3,5 µL TEMED

Lyseringsbuffer (2x, stock-løsning):

- 1,211 g Tris-base
- 8,766 g NaCl
- 3,7 g EDTA
- 500 mL milliQ vann

Ved bruk:

- 1 mL lyseringsbuffer (2x stock-løsning)
 - 200 µL 10 % NP-40
 - 20 µL Na_3VO_4
 - 500 µL NaF
 - 20 µL proteasehemmer (se senere)
 - 260 µL milliQ vann
- (Kan oppbevares kjølig opp til 2 uker.)

NP-40 (10 %):

- 1 mL NP-40
 - 9 mL milliQ vann
- (Varmes opp til 37°C og lagres deretter kjølig.)

Pervanadat

- 30 µL ortovanadat (0,01 M)
- 1 µL hydrogenperoksid (30 %)

Proteasehemmere (stock- løsning):

- 100 µg/mL antipain
 - 100 µg/mL pepstatin A
 - 100 µg/mL leupeptin
 - 100 µg/mL chymostatin
- (Løses i milliQ vann)

Protein transferbuffer (10x, stock-løsning):

- 30,3 g Trizma-base
 - 144,0 g glysin
 - 1000 mL milliQ vann
- (Ved bruk: 100 mL stock-løsning, 100 mL metanol og milliQ vann til 1000 mL)

Sample treatment buffer (2x, stock-løsning):

- 25 mL 0,5 M TrisCl, pH 6,8
 - 40 mL 10 % SDS
 - 20 mL 20 % Glyserol
 - 2 mg 0,03 M Bromofenolblått
 - 100 mL milliQ vann
- (Ved bruk: 9 deler stock-løsning og 1 del 2-mercaptoetanol.)

Separerende gel, 10 % (SDS-PAGE):

- 1,7 mL Duracryl
- 1,25 mL Tris-HCl (1,5 M)
- 0,05 mL 10 % SDS
- 2,0 mL milliQ vann
- 25 µL 10 % APS
- 1,7 µL TEMED

Tris buffered saline, TBS (10x, stock-løsning):

- 24,2 g Trizma-base
 - 80,0 g NaCl
 - 1000 mL milliQ vann
- (pH justeres til 7,6 vha. HCl og NaOH.)

Ved bruk: 1x TBS-T (tween)

- 100 mL stock-løsning (TBS)
 - 1 mL Tween20
 - milliQ vann til 1000 mL
- (pH justeres til 7,6 og løsning lagres kjølig.)

2.2.3 Væskestrømscytometri

PBS med 0,02 % natriumazid + 1 % kalveserum:

- 100 mL PBS
- 1 mL kalveserum
- 20 µL natriumazid

Paraformaldehyd (PFA)

- 2 % paraformaldehyd i PBS
- (Oppvarming til 67°C for å løse stoffet.)

2.3 Kjemikalier

Navn	Produsent
[Metyl ³ H] thymidin	Cal data, Hartmann Analytic
2-mercaptoethanol	SIGMA
Acridinorange	G.T. Gurr, Fluka
Ammoniumklorid	Merck
Ammoniumpersulfat, APS	BioRad Laboratories
Bromfenolblått	SIGMA
Detection Reagent1, Peroxide Solution	
Westernblotting Substrate	Pierce, Rockford
Detection Reagent 2, Luminol Enhancer Solution	
Westernblotting Substrate	Pierce, Rockford
DMSO, dimetylsulfoksid	SIGMA-ALDRICH
Duracryl, 30 %	Genomic solutions, Inc
Etidiumbromid	SIGMA
Etylendiamintetraeddiksyre, EDTA	SIGMA
Fettfri tørrmelk	NORMILK AS
Fikseringsvæske	Kodak
Fremkallingsvæske	Kodak
Glycerol, ca 87 %	Merck
Glycine minimum 99 %, TLC	SIGMA
HCl	Fra IMMI
Hydrogenperoksid, H ₂ O ₂	Norsk medisinal Depot
Metanol	VWR International
Microscint™ tellevæske	Perkin Elmer, Boston
Monothioglycerol	SIGMA
NaCl, natriumklorid	Merck
NaF, natriumfluorid	Merck
Na ₃ Vo ₄ , natriumorthovanadat minimum 90 %	SIGMA
NP-40	Cabiochem-Novabiochem Corporation
Paraformaldehyd, PFA, 95 %	SIGMA
Protein standard: Precision Plus Protein™	BioRad Laboratories
Sodiumdodecylsulfat, SDS	SIGMA
TEMED	BioRad Laboratories
Trizma Base	SIGMA
Tween20, polyoxyetylen sorbitan monolaurate	SIGMA

2.4 Kit

Type kit	Produsent
Cloned AMV, First strand synthesis Kit	Invitrogen
Cytokine 25-Plex	Biosource International
RNeasy®MiniKit	QIAGEN
SYBR®Green PCR Core Reagents	Applied biosystems

2.5 Medier og løsninger

Navn	Produsent
BSA, rinderalbumin 30 %	Biotest
D-PBS, Dulbeccos fosfatbufrede saltvann	GIBCO, Invitrogen Corporation
Dietyl pyrokarbonat (DEPC) behandlet vann	Fra IMMI
Føtalt kalveserum	GIBCO, Invitrogen Corporation

Garamycin (40mg/mL)
Ikke essensielle aminosyrer, 100x
Lymphoprep™
Natriumkloridløsning, 0,9 %
Natriumpyruvatløsning
PBS med natriumazid, 0,02 %
PIERCE ECL Westernblotting Substrate
Polymorphprep
Proteasehemmere
(Antipain, pepstatin A, leupeptin, chymostatin)
RPMI 1640, 1x
RPMI 1640 med L-glutamin

SheringPlough
PAA Laboratories
Fresenius Kabi Norge
B. Braun Melsungen AB
PAA Laboratories
Fra IMMI
PIERCE
Fresenius Kabi Norge AS

SIGMA
PAA Laboratories
GIBCO, Invitrogen Corporation

2.6 Proteiner/Antistoffer/Aktivatører

2.6.1 RT-PCR

Primere for RT-PCR ble levert av Eurogentec.

2.6.2 Antistoffreagenser

Navn	Produsent
Anti Human C3a Reseptor	HyCult biotechnology bv
Anti Human C5a Reseptor	HyCult biotechnology bv
4G10, anti-fosfotyrosin	Renset ut på IMMI
Anti-aktin	SIGMA
Anti-fosfo p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology
Anti-fosfo SAPK/JNK (Thr 183/Tyr 185)	Cell Signaling Technology
Anti-SAPK/JNK	Cell Signaling Technology
Anti-IkB-α	Cell Signaling Technology
Anti-CD3-PE	DIATEC
Anti-CD3-FITC	DIATEC
Anti-CD56-FITC	SEROTEC
Anti-CD56-PE	StemCell Technologies, Inc
Anti-C5aR-PE	Biosciences Pharmingen
Geit-anti-kanin IgG (H+L) HRP	Southern Biotechnology associated, Inc
Geit-anti-mus IgG-HRP	Southern Biotechnology associated, Inc
Geit-anti-mus IgG2b-HRP	Southern Biotechnology associated, Inc
Geit-anti-mus IgG-FITC	Southern Biotechnology associated, Inc
Geit-anti-mus IgG-PE	Southern Biotechnology associated, Inc
Muse IgG	Renset ut på IMMI
Anti-CD3	Renset ut på IMMI fra OKT3
Anti-CD3/CD28 partikler	Dynal, Invitrogen
C5a	Sigma
C3a	Sigma

3 METODER

3.1 Cellearbeid

I oppgaven ble det brukt Jurkat E6.1, som er en human leukemi T-cellelinje (Gillis and Watson, 1980), mononukleære celler fra blod (MNC), rensede humane T-celler og granulocytter. Arbeid med celler ble utført i steril labbenk, og cellene ble oppbevart i inkubatorskap ved 37°C, 5 % CO₂ og 100 % luftfuktighet.

3.1.1 Celledyrking- og splitting av Jurkat E6.1

Materialer

Celledyrkingsflasker (Easy Flasks), RPMI 1640 med 10 % FCS, CO₂ inkubator.

Prosedyre

Cellekulturarbeidet ble i hovedsak utført på humane T-celler og Jurkat E6.1. Både T-celler og Jurkat E6.1 ble holdt gående i kultur i inkubatorskap ved 37°C, CO₂ metning på 5 %, og 100 % luftfuktighet. Jurkat E6.1 ble dyrket i EasyFlasks i RPMI 1640 med 10 % FCS med en startkonsentrasjon på $2 \cdot 10^5$ celler/mL. Når kulturene nådde $2 \cdot 10^6$ celler/mL ble de splittet og sådd ut på nytt. Humane T-celler ble kultivert ved en konsentrasjon på 10^6 celler/mL, og splittet ved behov.

3.1.2 Celletelling

Materiale

Partikkelteller, 0,9 % NaCl.

Prosedyre

Cellekonsentrasjon i kulturen ble bestemt ved hjelp av en partikkelteller, Coulter Z1. 20 µL cellesuspensjon ble fortynnet i 10 mL 0,9 % NaCl i dH₂O og telt.

3.1.3 Frysing av celler

Materiale

Innfrysningsmedium, RPMI 1640 med 10 % FCS, cryorør, -70°C fryser, nitrogentank.

Prosedyre

Jurkat E6.1, humane T-celler og MNC ble oppbevart i flytende nitrogen. Det ble laget et innfrysningsmedium bestående av RPMI 1640 med 10 % FCS og 20 % DMSO. DMSO ble tilsatt dråpevis til RPMI 1640 med 10 % FCS under konstant omrøring. Varmeutvikling ble forhindret ved å gjøre tilsetning av DMSO på is. Celler fikk tilsatt et likt volum innfrysingsmedium som eget volum. Det hele utført under konstant omrøring. 1 mL cellesuspensjon ble overført til cryorør. Celler ble fryst ned med en konsentrasjon på $5 \cdot 10^6$ - 10^7 celler/mL. Rørene ble inkubert på is i 10 min (minutter), før de ble overført til -70°C fryser. Etter minst 4 timer ble de overført til nitrogentank.

3.1.4 Tining av celler fra nitrogentank

Materiale

RPMI 1640 med 10 % FCS, vaskebuffer (RPMI 1640), vannbad 37°C, sentrifugerør.

Prosedyre

En ampulle med celler ble tatt opp av nitrogentank og straks overført til 37°C vannbad der det ble tint til kun en liten isklump var å se. Deretter ble cellene overført til sentrifugerør, tilsatt 10 mL RPMI 1640 og sentrifugert ved 1300 rpm i 10 min. Supernatant ble sugd av, og cellene ble vasket med nye 10 mL RPMI 1640. Etter tre vask ble pellet resuspendert i 1 mL RPMI 1640 med 10 % FCS og telt. Cellene ble dyrket videre som beskrevet over eller brukt direkte i forsøk.

3.1.5 T-celle stimulering

Materiale

RPMI 1640 med 10 % FCS, vaskebuffer (RPMI 1640), anti-CD3/CD28 partikler ($1.5 \cdot 10^{-8}$ partikler/mL), eppendorfrør, sentrifugerør, magnetstativ, 24-brønners plate med flat bunn.

Prosedyre

T-celler ble stimulert med anti-CD3/CD28 partikler. Cellene, med en konsentrasjon på 10^6 /mL, ble fordelt i en 24 brønners plate, 0,5 mL i hver brønn. Partiklene ble deretter tilsatt cellene. Det ble anvendt 3 partikler/celle. Etter 24 timer ble partiklene fjernet fra cellene ved hjelp av en magnet. Cellene ble deretter resuspendert i RPMI 1640 med 10 % FCS til en konsentrasjon på 1 mill/mL.

3.1.6 Isolering av mononukleære celler (MNC) fra perifert blod

Materiale

Heparinisert blod, 0,9 % NaCl, Lymphoprep, RPMI 1640 med 10 % FCS, sentrifugerør, sentrifuge, celledyrkingsflasker.

Prosedyre

MNC ble isolert ved hjelp av tetthetsgradientsentrifugering. Det ble fordelt 15 mL fysiologisk saltvann (0,9 % NaCl) i hvert rør. Deretter tilsatt 15 mL blod i hvert av rørene, før gradientmediet ble tilsatt i bunnen av sentrifugerøret. Rørene ble sentrifugert ved 1500 rpm i 30 min. Etter sentrifugeringen kunne man se forskjellige sjikt i sentrifugerøret, der de mononukleære cellene lå i interfasen mellom plasma/saltvannssjikt og sjiktet med Lymfoprep. Dette sjiktet ble isolert og det ble tilsatt lik mengde vaskebuffer (RPMI 1640) som mengde isolerte MNC i hvert rør. Ny sentrifugering ved 800 rpm i 20 min ble utført (fjernet uønskede blodplater). Tilslutt ble løsningen vasket 3 ganger med RPMI 1640, før den ble resuspendert i 1 mL RPMI 1640 med 10 % FCS og antall celler ble bestemt. Cellene ble enten frosset ned etter ordinær fryseprotokoll, eller inkubert i plastflasker (Easy Flask) ved en konsentrasjon på 1 mill/mL. Monocyttene vil i dette trinnet feste seg til plasten i flaskene og dermed ikke bli med videre i isoleringstrinnene. Cellene ble inkubert på plast i inkubatorskap ved 37°C og 5 % CO₂ til neste dag, da videre isolering av T-celler ble utført.

3.1.7 Isolering av T-celler på nylonsøyle

Materiale

Sprøyte (10 mL beholder), nylonull, MNC, RPMI med 10 % FCS, stativ med klyper, sentrifugerør.

Prosedyre

Passende kolonne (engangssprøyte) ble pakket med nylonull og ekvilibrert med RPMI 1640 med 10 % FCS i 20 minutter. RPMI 1640 med 10 % FCS ble så eluert, og de mononukleære cellene (gått 24 timer på plast) ble satt på kolonnen. Søylene ble plassert i inkubatorskap i 30 min. Cellene ble deretter vasket ut av søylene med RPMI 1640 med 10 % FCS. Vaskeprosedyre ble utført 4 ganger. I dette trinnet vil hovedsakelig T-celler klare å passere kolonnen og komme ut i eluatet. Oppsamlingsrøret ble sentrifugert ned ved 1300 rpm i 10 min, og resuspendert i 1 mL RPMI 1640 med 10 % FCS. Antall celler ble bestemt, og deretter frosset ned etter innfrysningsprotokoll.

3.1.8 Granulocytt isolering

Materiale

Humant blod, Polymorphprep, 0,45 % NaCl, 0,9 % NaCl, RPMI 1640 med 10 % FCS, sentrifugerør, sentrifuge.

Prosedyre

Ved granulocyttilisering ble det brukt Polymorphprep. 5 mL Polymorphprep ble tilsatt i et sentrifugerør. Det ble deretter tilsatt 5 mL heparinisert blod på toppen uten å la sjiktene blande seg. Rørene ble så sentrifugert i 30 min ved 1500 rpm. Etter sentrifugering ble granulocyttraksjonen isolert. Det ble deretter tilsatt lik mengde 0,45 % NaCl som granulocyttraksjonens mengde. Prøven ble tilslutt vasket to ganger med 0,9 % NaCl. Etter siste sentrifugering ble granulocyttpelletten resuspendert i 1 mL RPMI 1640 med 10 % FCS og antall celler ble bestemt.

3.1.9 Viabilitetstest

Materiale

Etidiumbromid/acridinorange, objektglass, dekkglass, fluorescensmikroskop.

Prosedyre

Cellenes viabilitet ble testet ved at en dråpe cellesuspensjon ble lagt på objektglass, og en dråpe etidiumbromid/acridinorange ble tilsatt i denne dråpen. Et dekkglass ble lagt over prøven og prøven ble undersøkt i et fluorescensmikroskop. Levende celler fremkommer som gule/grønne, mens døde celler fremkommer som røde.

3.2 Real time RT-PCR

Materiale

T-celler, Jurkat E6.1, anti-CD3/CD28 ($1.5 \cdot 10^{-8}$ partikler/mL), RNeasy®MiniKit, Cloned AMV, First strand synthesis Kit, SYBR®Green PCR Core Reagents, DEPC (dietyl pyrokarbonat) behandlet vann, forward og revers primere for C5aR, C3aR, C5L2 og GADPH, GeneAmp®PCR System 9700, ABI PRISM®7000 Sequence Detection system.

Prosedyre

I real time RT-PCR kvantiteres mengden PCR produkt i hver syklus ved hjelp av fluorokromet SYBR® Green som kun fluoriserer ved binding til dobbeltråd DNA. Innledende starter man med en viss konsentrasjon isolert mRNA, og det syntetiseres cDNA utfra dette. Ved hjelp av spesifikke primere kan man deretter amplifisere opp ønsket genprodukt ved hjelp av real time RT-PCR. Mengden fluoresens måles i hver syklus slik at man kan sammenligne relative mengder amplifisert genprodukt. Det ble brukt to celletyper i forsøket, humane T-celler og Jurkat E6.1, der T-cellene ble stimulert med anti-CD3/CD28 partikler 24 timer før isolering av mRNA for å øke mRNA mengden i cellene. mRNA ble isolert fra $3 \cdot 10^6$ - $4 \cdot 10^6$ celler med RNeasy®MiniKit (QIAGEN, 2006) i henhold til protokoll fra leverandør. mRNA mengde ble kvantitert og konsentrasjon utregnet. 10 ng mRNA ble brukt i cDNA syntese reaksjon som ble utført i henhold til protokoll fra leverandør (Cloned AMV, First strand synthesis (INVITROGEN, 2005)). Ved real time RT-PCR ble det brukt 5 µL cDNA, 2 µL forward (F) primer og 2 µL revers (R) primer i hver reaksjon. Primer/reseptor-løsningene ble på forhånd laget i en 1:10 fortynning (opprinnelig konsentrasjon 100 µM). Prosedyre

utført etter manual i kit; SYBR®Green PCR Core Reagents (AppliedBiosystems, 2006). Følgende primere ble benyttet i oppsettet:

C5aR (F), 5'-CAC-CTT-CTT-GCT-GCT-GAA-TA-3'
C5aR (R), 5'-GGT-CTT-CTG-GGC-CAT-AGT-GT-3'
C3aR (F), 5'-ACC-AGC-CCA-CTG-GAT-AAC-TC-3'
C3aR (R), 5'-TTC-GGA-AGA-CAA-TGA-AGC-TG-3'
C5L2 (F), 5'-CCT-GGT-GGT-CTA-CGG-TTC-AG-3'
C5L2 (R), 5'-GGG-CAG-GAT-TTG-TGT-CTG-TT-3'
GADPH (F), 5'-CCA-AGG-TCA-TCC-ATG-ACA-ACT-T-3'
GADPH (R), 5'-AGG-GGC-CAT-CCA-CAG-TCT-T-3'

3.3 Væskestrømscytometri

Materiale

96-brønners mikrotiterplate med spiss bunn, RPMI 1640 med 10 % FCS, PBS med 0,02 % natriumazid og 1 % FCS, sentrifuge, aluminiumsfolie, anti-C5aR (10 µg/mL), anti-C3aR (2 µg/mL), geit-anti-mus IgG-FITC (50 µg/mL), anti-CD3/CD28 ($1.5 \cdot 10^{-8}$ partikler/mL), anti-CD3-PE (0,4 µg/mL), anti-CD56-PE (2,5 µg/mL), anti-CD3-FITC (0,4 µg/mL), anti-CD56-FITC (10 µg/mL) anti-C5aR-PE (2,5 µg/mL), geit-anti-mus IgG-PE (50 µg/mL), muse Ig (2 µg/mL), 2 % PFA (paraformaldehyd), væskestrømscytometer (FACS Calibur, MAC computer med CellQuest™ programvare).

Prosedyre

I væskestrømscytometri karakteriserer eller separerer man partikler på bakgrunn av partiklenes relative fluorescens. $2 \cdot 10^5$ celler/prøve ble resuspendert i PBS med 0,02 % natriumazid og 1 % FCS og deretter overført til en spissbunnet 96 brønners plate. Primært antistoff ble tilsatt og platen ble inkubert på is i 30 min. Deretter ble prøvene sentrifugert ned ved 1300rpm i 5 min og vasket 2 ganger i PBS med 0,02 % natriumazid og 1 % FCS. I neste trinn ble sekundært antistoff tilsatt, og prøvene ble inkubert på is i 45 min. Ny sentrifugering og vaskeprosedyre ble utført. I et siste trinn ble det i noen av oppsettene tilsatt et blokkeringsmiddel, samt en eventuell dobbeltfarging med nytt direktekonjugert antistoff. Prøvene stod nok en gang på is i 45 min før de ble sentrifugert ned på nytt og vasket. Prøvene ble så enten analysert med det samme ved hjelp av væskestrømscytometri, eller de ble fiksert med 2 % PFA (paraformaldehyd) og lagret kjølig til neste dag, da de ble analysert ved hjelp av væskestrømscytometri, som normalt.

3.4 Separering og detektering av proteiner

3.4.1 Stimulering, lysering og prøveopparbeidelse av celler for kjøring på dodecylsulfat polyacrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE)

Materiale

RPMI 1640 med 10 % FCS, Dulbeccos fosfatbufrede saltvann (D-PBS), lyseringsbuffer, anti-CD3 (0,5 mg/mL), anti-CD3/CD28 ($1.5 \cdot 10^{-8}$ partikler/mL), C5a (10 μ M), PMA (10 μ g/mL), pervanadat (1 mg/mL), prøvebuffer, 4°C sentrifuge, 37°C vannbad, varmeblokk (95°C).

Prosedyre

I forsøket ble det brukt både naive T-celler og T-celler stimulert med anti-CD3/CD28 partikler 7-8 dager tidligere, og som dermed ble restimulert i forsøket. Cellene ble sentrifugert ned ved 1300 rpm i 10 min, og resuspendert i 1 mL RPMI med 10 % FCS. Det ble brukt $0,5 \cdot 10^6$ celler i 100 μ L/prøve. Ulike stimuleringsprosedyrer ble gjennomført avhengig av type stimulator:

- Anti-CD3 stimulering ble prøvd ut på to måter. Cellene ble først plassert på 37°C i vannbad før anti-CD3 antistoff (10 μ g/mL) ble tilsatt i prøvene 15 min senere. Det ble deretter utført kinetikktester der stimuleringstid hadde tidsintervallene, 3min, 5 min, 10 min, 20 min etter anti-CD3 (10 μ g/mL) ble tilsatt. Det ble også prøvd ut å tilsette anti-CD3 antistoff til cellene mens de fortsatt stod på is. Cellene ble deretter plassert i 37°C vannbad i ønsket tidsintervall.
- Det ble også utført stimulering og restimulering av celleprøvene med anti-CD3/CD28 partikler (3 partikler/celle) mens prøvene stod på is, samt etter 15 min i 37°C vannbad. Celler som ble stimulert på is fikk tilsatt 3 partikler/celle, og ble deretter sentrifugert raskt ned. Prøvene stod på is i 5 min før de ble resuspendert og plassert i 37°C vannbad i ønsket tidsintervall. Cellene som ble stimulert rett i vannbadet, stod først 15 min i 37°C vannbad, og ble deretter tilsatt partikler.
- Det ble også utført stimuleringer med C5a (0,25 μ M), både alene og i kombinasjon med anti-CD3/CD28 partikler (3 partikler/celle). Det ble benyttet samme prosedyre som beskrevet over.

- Det ble medberegnet kontrollprøver. Ustimulert prøve var negativ kontroll, og PMA (50 ng/mL, 1 time stimulering) og pervanadat (15 µg/mL, 3 minutter stimulering) ble brukt som positive kontroller.

Etter stimulering ble prøvene tilsatt likt volum kald PBS (100 µL), og deretter inkubert på is til de var avkjølt. Prøvene ble sentrifugert ned og supernatant ble sugd av. 100 µL lyseringsbuffer ble tilsatt hver enkelt cellepellet og prøvene ble inkubert på is i 30 min. Tilslutt ble prøvene sentrifugert ned ved 1300 rpm i 10 min ved 4°C. Supernatant ble overført til nye rør som inneholdt 100 µL prøvebuffer. Prøvene ble kokt på varmeblokk i 5 min ved 95°C, avkjølt og eventuelt spunnet raskt ned. Prøver ble separert ved SDS-PAGE eller oppbevart ved -20°C inntil de skulle brukes.

3.4.2 SDS-PAGE

Materiale

Separerende og konsentrerende gelløsning, elektroforesebuffer, proteinstandard, utstyr beskrevet i brukermanual til Mini Protean® 3 Cell (BioRadLaboratories, 2006).

Prosedyre

Separering av proteiner i prøvene ble utført ved hjelp av SDS polyakrylamidgelelektroforese etter standard Laemmli prosedyre (Laemmli, 1970), der det ble benyttet 20 mA (milliamper) per gel. SDS-PAGE gelene ble tillaget med en 4 % separerende gel og en 10 % konsentrerende gel.

3.4.3 Westernblotting

Materiale

PVDF-membran (polyvinyliden difluorid-membran), metanol, milliQ vann, proteinoverføringsbuffer, filterpapir, Hoefer®TE77XP Semi-Dry Transfer Unit, blokkeringsbuffer med 3 % bovint serumalbumin (BSA), blokkeringsbuffer med 5 % fettfri tørrmelk, primært antistoff, sekundært antistoff konjugert med HRP (horse radish peroxidase), SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, CL-Xposure™ film, Kodak kassett, Kodak fikseringsvæske, Kodak fremkallingsvæske.

Tabell 3.1. Oversiktstabell over type primære og sekundære antistoffer som ble brukt i Westernblot analysene, samt blokkeringsbuffer som ble brukt i hvert enkelt tilfelle. Antistoffenes bruksfortynning er vist i parentes.

Primært antistoff	Fosforyleringssteder	Sekundært antistoff	Blokkeringsbuffer til blokkering	Blokkeringsbuffer til fortynning av antistoff
4G10 (0,8 µg/mL)		Geit-anti-musIgG2b-HRP (1:4000)	Blokkeringsbuffer med 3 % BSA	Blokkeringsbuffer med 3 % BSA
Anti-fosfo p44/42 MAP kinase (anti-pERK) (1:2000)	Thr 202 Tyr 204	Kanin-anti-mus IgG-HRPO (1:4000)	Blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk	Blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk
Anti-IkB-α (1:1000)		Kanin-anti-mus IgG-HRPO (1:4000)	Blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk	Blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk
Anti-fosfo SAPK/JNK (1:2000)	Thr 183 Tyr 185	Kanin-anti-mus IgG-HRPO (1:4000)	Blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk	Blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk
Anti-SAPK/JNK (1:1000)		Geit-anti-kanin (H+L) IgG-HRP (1:4000)	Blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk	Blokkeringsbuffer med 3 % BSA til 1 ^o antistoff og blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk til 2 ^o antistoff
Anti-aktin (1:10 000)		Geit-anti-kanin (H+L) IgG-HRP (1:4000)	Blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk	Blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk

Prosedyre

Da proteinene var separert ved SDS-PAGE ble gelen tatt ut av gelkammer, konsentrerende gel ble fjernet og separerende gel ble lagt i proteinoverføringsbuffer. PVDF membranen ble bløtlagt i metanol i 20 sekunder, og deretter vasket med milliQ vann, før den til slutt ble overført til proteinoverføringsbuffer. Både gelen og membranen stod i proteinoverføringsbuffer i 10 min på rister. I selve blottingen ble det brukt filterpapir, som var bløtlagt i proteinoverføringsbuffer. Det ble lagt 4 lag filterpapir i bunn av blotter, deretter PVDF-membran, gel ble plassert over membran, og 4 lag filterpapir ble lagt på toppen. Proteinene ble overført elektroforetisk fra gelen til PVDF-membranen med 65 mA per gel.

Etter blotting ble membranen lagt i passende blokkeringsbuffer (Tabell 3.1), der membran ble blokkert i 1-2 timer på vippe i romtemperatur. Etter blokkering ble det tilsatt ønskelig type og konsentrasjon primært antistoff, fortynnet i korresponderende blokkeringsbuffer (Tabell 3.1), og membran ble plassert kaldt (4°C) natten over på vippe. Neste dag ble membranen vasket 5·10 min med TBS-T før membran ble inkuberte 1-2 timer med ønsket sekundært antistoff i riktig konsentrasjon fortynnet i blokkeringsbuffer med 3 % BSA eller 5 % fettfri tørrmelk. (Tabell 3.1). Vask med TBS-T ble deretter gjentatt 5·10 min.

Ved fremkalling ble det benyttet ECL (Super Signal) som substrat for HRP. Membranen ble inkubert 5 min i løsningen. Deretter ble membranen lagt i fremkallingskassett og eksponert på røntgenfilm. Tilslutt ble røntgenfilmen fremkalt og fiksert.

3.5 *In vitro* celleproliferasjonsassay

Materiale

96 brønners mikrotiterplate, CO₂ inkubator, RPMI 1640 med 10 % FCS, D-PBS, C5a (10 µM), anti-C5aR (10 µg/mL), anti-CD3/CD28 partikler (1.5x 10⁸ partikler/mL), anti-CD3 (0,5 mg/mL), KAM IgG (1 mg/mL), ³H thymidin, glasfiberfilter, OmniFilter beholdere, Filtermate Harvester, tellervæske, Packard-telleren Top Count NTX™.

Prosedyre

Celler med konsentrasjon 1 mill celler/mL ble fordelt i triplikater i en 96 brønners plate med flat bunn, der hver prøve var på 100 µL, det vil si 100 000 celler/prøve. Det ble deretter tilsatt ønsket stimulering i hvert triplikat. Platen ble plassert i inkubatorskap ved 37°C og 5 % CO₂ i 48 timer. Følgende oppsett ble utført:

- Første triplikat bestod av kun naive/hvilende T-celler. I andre triplikat ble T-cellene stimulert med anti-CD3/CD28 partikler (3 partikler/celle), mens tredje triplikat ble stimulert med anti-CD3/CD28 partikler, samt C5a (0,25 µM).
- T-cellene ble også stimulert med anti-CD3/CD28 partikler 8-10 døgn før de ble fordelt i triplikater (3 partikler/celle). Etter 8-10 døgn ble det satt opp ett triplikat som kun bestod av disse nå hvilende cellene. Neste triplikat ble stimulert med anti-CD3/CD28, mens tredje triplikat ble stimulert med anti-CD3/CD28, samt C5a (0,25 µM).

- Proliferasjonsmålinger ble også testet ved kryssbinding. Her var første triplikat kun naive/hvilende T-celler. I andre triplikat ble de naive T-cellene stimulert med anti-CD3 (10 µg/mL), samt tilsatt KAM IgG (200 µg/mL). Mens i tredje triplikat ble det i tillegg til anti-CD3 og KAM IgG stimulert med anti-C5aR (10 µg/mL). Denne kryssreaksjonen ble også utført på T-celler stimulert med anti-CD3/CD28 i 8-10 døgn.
- Det ble også testet proliferasjon på naive T-celler stimulert med anti-CD3 (10 µg/mL) og anti-C5aR (10 µg/mL). Første triplikat bestod som tidligere av naive/hvilende T-celler, mens andre triplikat ble stimulert med anti-CD3. Tredje triplikat ble stimulert med anti-CD3, samt anti-C5aR. Dette oppsettet ble også utført på T-celler stimulert med anti-CD3/CD28 i 8-10 døgn.

I de oppsettene der T- cellene ble stimulert med anti-CD3/CD28 8-10 døgn før oppsett på plate og ny stimulering, ble det i enkelte av tilfellene skiftet mediet på T-cellene de to siste døgnene for å prøve å senke proliferasjon før stimulering. Ved å skifte medie vil man senke IL-2 nivået i prøven og cellenes proliferasjon vil da synke.

Etter 48 timer i inkubatorskap ved 37°C og 5 % CO₂ ble cellene pulset med 20 µL [³H] TdR, for så å bli inkubert ved samme betingelser i 24 timer til. Etter 24 timer ble prøvene høstet ved hjelp av Filtermate Harvester. Et glassfiberfilter ble fuktet 2-3 ganger med destillert vann. Deretter ble celsuspensjonen sugd opp ved hjelp av vakuum. Så ble filteret vasket 4-5 ganger med destillert vann slik at cellene lyserte. Filter ble plassert i 50°C inkubatorskap til tørking i minimum 45 min, og etter tørking ble filter plassert mellom to OmniFilter-holdere. Hver brønn fikk tilsatt 25 µL tellervæske, og holder ble dekket med Top Seal™ før filterholderen ble plassert i β-telleren Top Count NTX™, der hver prøve ble talt i 1 min.

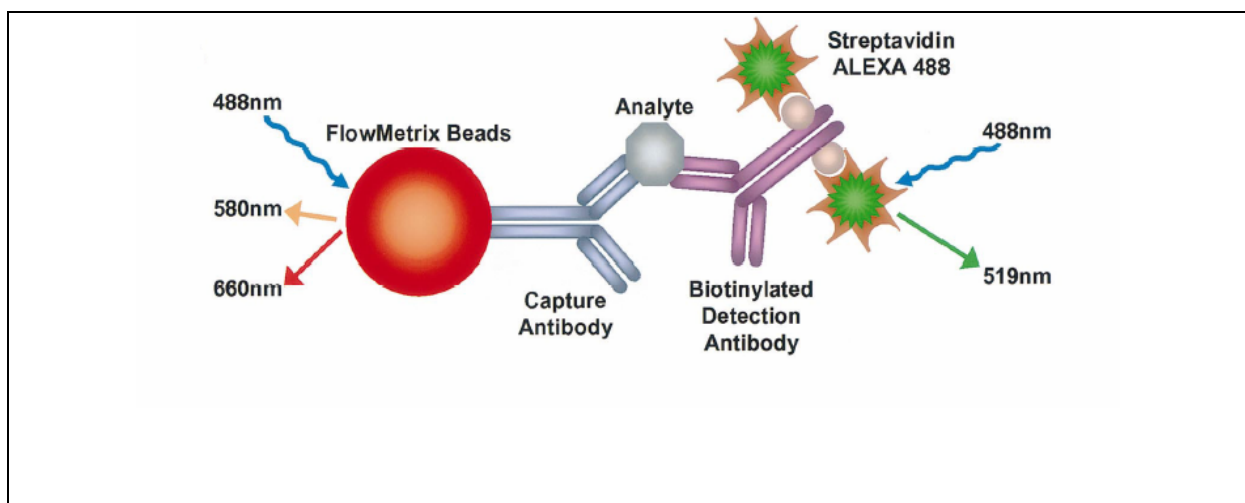
3.6 Cytokinanalyse

Materiale

Anti-CD3/CD28 partikler ($1,5 \cdot 10^8$ partikler/mL), humane T-celler, C5a ($10 \mu\text{M}$), humant cytokin 25-plex kit fra Biosource, Luminex 100™ instrument.

Prosedyre

Det ble undersøkt mengde cytokiner i ulike prøver, der det ble tatt i bruk et multiplex partikkelbasert immunoassay (Biosource, Invitrogen cytokines & signaling, 2007). Det brukes partikler som er konjugert med antistoffer som binder seg til sine respektive cytokiner. Etter cytokin-antistoff binding tilsettes analyttspesifikke biotinylerte antistoff som binder til analytten. Denne biotinyleringen medfører at komplekset kan binde seg til detektorsystemet, her; streptavidin-R-phykoerytrin (RPE). Man kan så bestemme konsentrasjonen på en eller flere av analyttene ved å måle spektralegenskapene til partiklene og bestemme mengde RPE-fluorescens.



Figur 3.1 (Vignali, 2000). Multiplex partikkelbasert immunoassay: partikler med konjugert antistoff, som binder til sine respektive cytokiner. Tilsettes så biotinylert deteksjonsantistoff som gjenkjenner og binder epitoper på analytten. Komplekset kan nå binde i et detektorsystem, her Streptavidin-RPE. Ved å måle mengde RPE-fluorescens, finner man konsentrasjonen på en eller flere analytter.

Det ble benyttet supernatant fra anti-CD3/CD28 stimulerte T-celler (3 partikler/celle), 10^6 T-celler/prøve. T-cellene ble stimulert i 18 timer med eller uten C5a ($0,25 \mu\text{M}$). Det ble fulgt prosedyre for klargjøring av prøvene etter protokoll i kit (INVITROGEN, 2007), og selve analysen ble utført på Luminex-100.

4 RESULTATER

4.1 RT-PCR: Påvisning av mRNA for C5aR, C3aR og C5L2 i Jurkat E6.1 og stimulerte T-celler

Målet med oppgaven var blant annet å påvise tilstedeværelsen av funksjonelle reseptorer for C5a, C3a og C5L2 på humane T-celler. Innledningsvis ble det utført real time RT-PCR for å påvise mRNA for reseptorene. En eventuell tilstedeværelse av mRNA for reseptorene i cellen, vil danne et grunnlag for å videre studere uttrykket av reseptorene i membranen. Det er tidligere påvist mRNA for C5aR i T-celler (Nataf et al., 1999). Dette ble forsøkt reproduisert, men cellene ble også undersøkt for mRNA for C3aR og C5L2. Relativ kvantitering av mRNA ble utført både i T-cellelinjen Jurkat E6.1 og stimulerte T-celler fra normalt perifert blod. T-cellene ble stimulert da dette øker mengde mRNA i cellen.

Tabell 4.1. RNA ble isolert fra anti-CD3/CD28 stimulerte humane T- celler og ustimulert Jurkat E6.1. cDNA ble deretter syntetisert ved hjelp av revers transkripsjon, og PCR ble utført med primere spesifikke for C5aR, C3aR, C5L2 og GADPH (kontroll).

Cellotype	Type reseptor	C _T	ΔC_T $C_{T(\text{reseptor})} - C_{T(\text{GADPH})}$
Humane T-celler	C5aR	30,21	5,87
	C3aR	30,96	6,62
	C5L2	Ubestemt	-
	GADPH	24,34	-
Jurkat E6.1	C5aR	28,73	10,94
	C3aR	29,24	11,45
	C5L2	39,83/ ubestemt	-
	GADPH	17,79	-

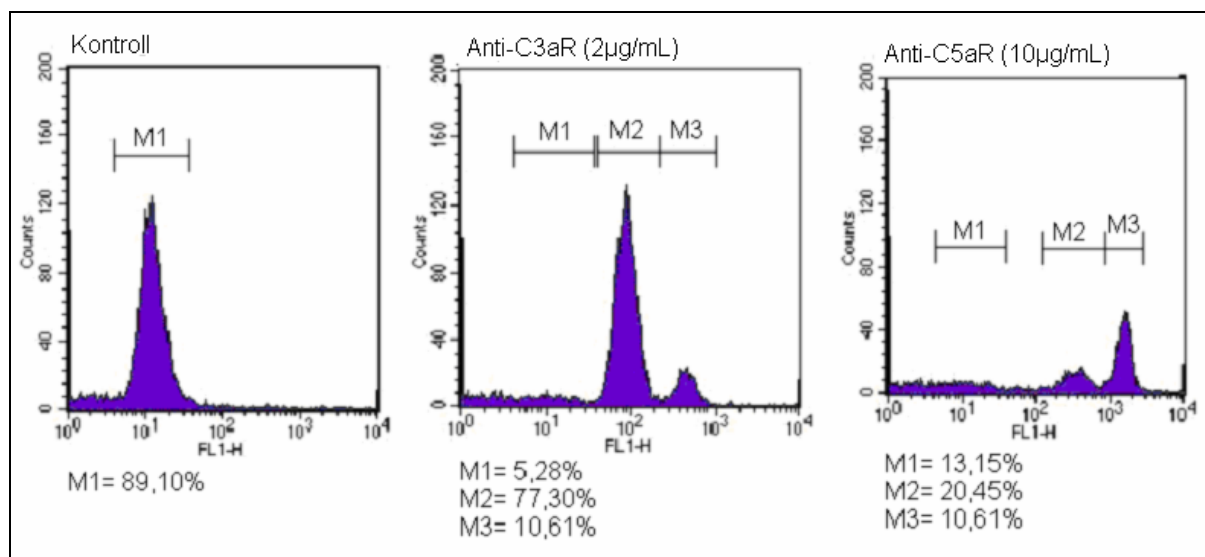
C5aR mRNA ble påvist i både stimulerte T-celler og Jurkat E6.1. I tillegg ble det påvist C3aR mRNA i begge celletypene. C5L2 ble ikke påvist i verken T-celler eller Jurkat E6.1. Resultatet viser at T-cellene har en lavere ΔC_T -verdi, det vil si mer mRNA, enn Jurkat E6.1.

4.2 Detektering av C3aR og C5aR ved hjelp av væskestrømcytometri

Real time RT-PCR forsøkene viste tilstedeværelse av C5aR og C3aR i T-celler på mRNA-nivå. I væskestrømcytometri analyserer man hver enkelt celle i en cellepopulasjon og kan derfor blant annet brukes til å undersøke cellenes overflatemarkører. Ekspresjon av reseptorene i T-cellemembranen ble derfor testet ved hjelp av væskestrømcytometrianalyser.

4.2.1 Påvisning av C3aR og C5aR på granulocytter

Granulocytter uttrykker både C3aR og C5aR og cellene ble derfor farget som positiv kontroll for prosedyren. Som vist i Figur 4.1 var granulocytterne positive for begge reseptorene.



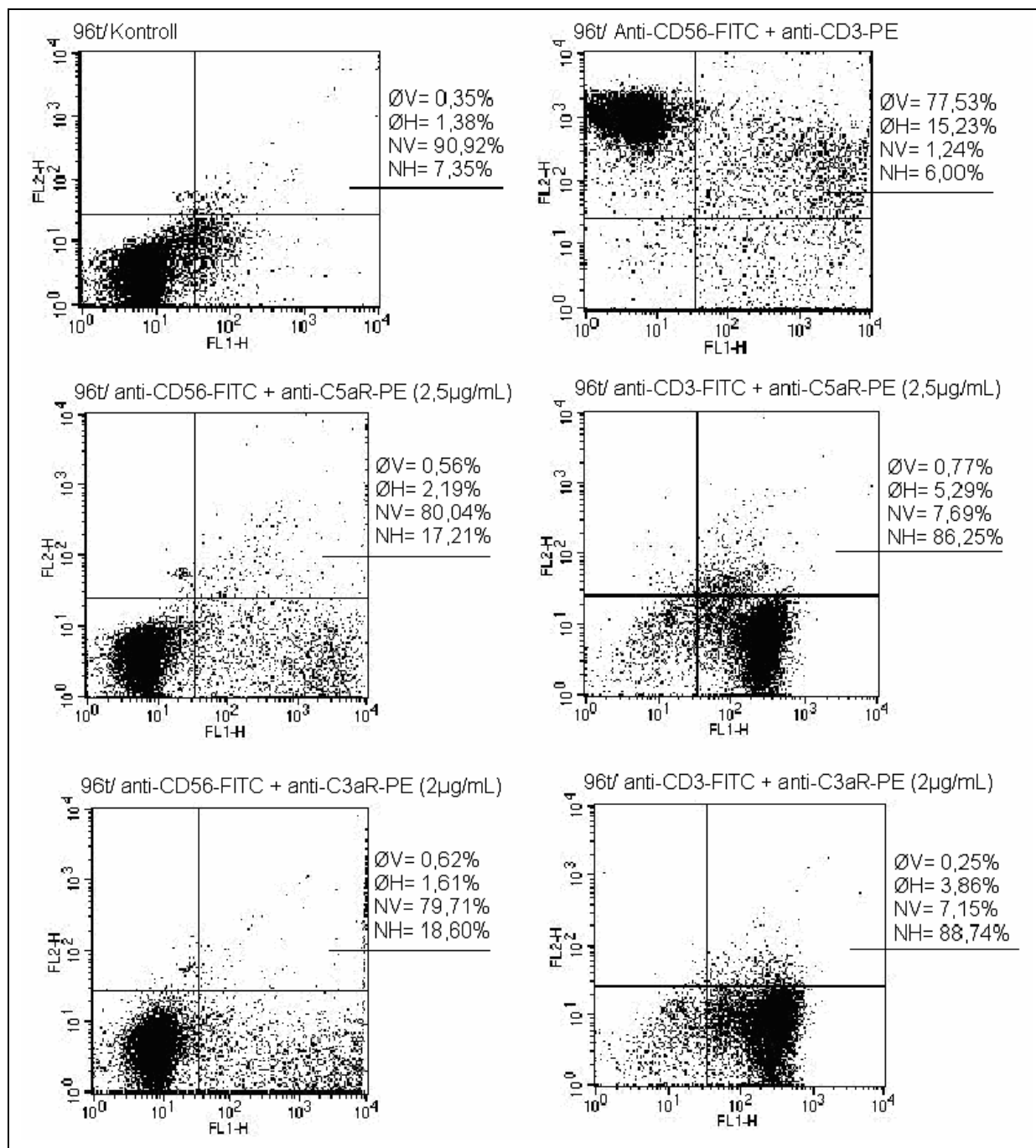
Figur 4.1 $2 \cdot 10^5$ granulocytter/prøve, der en prøve bestod av granulocytter konjugert med GAM-IgG-FITC (kontroll), andre prøve ble farget med anti-C3aR (2 µg/mL) og tredje prøve ble farget med anti-C5aR (10 µg/mL). Figuren er representativ for ett oppsett.

Ved å farge granulocytter med antistoffer mot C5aR og C3aR ble det verifisert at antistoffene fungerte og at systemet kunne brukes videre til å påvise reseptorene på T-celler.

4.2.2 Detektering av C5aR og C3aR på 24, 48, 72 og 96 timers stimulerte T- celler, farget med anti- CD56- FITC, anti- CD3- FITC og anti- CD3- PE

T-cellene benyttet i væskestrømcytometrianalysene ble rensset ut fra MNC på nylonsøyle. Det er mer korrekt å betegne cellene for delvis rensede T-celler, da kulturen kan tenkes å inneholde andre celletyper. Det er stor sannsynlighet for tilstedeværelsen av NK-celler, da disse renses fra MNC etter samme prinsipp som T-celler. Det ble derfor benyttet spesifikke markører for å skille mellom de to celletypene. CD3 er et overflatemolekyl assosiert med TCR. Den er spesifikk for T-celler, og kan derfor brukes som T-cellemarkør. Membranmolekylet CD56 er spesifikk for NK-celler og kan brukes for å påvise NK-celler. Cellene ble derfor farget med fluorokrom merkede antistoffer mot CD3 og CD56 i kombinasjon med både anti-C5aR og anti-C3aR. Dette for å verifisere at eventuelt påvist reseptor ble påvist på CD3-positive T-celler.

Nataf et al. viste i 1999 en høyere ekspresjon av C5aR i T-celler stimulert over lengre tid. Det ble derfor utført kinetikkstudier der T-cellene ble farget med antistoffer 24 timer, 48 timer, 72 timer og 96 timer etter anti-CD3/CD28-stimulering. Resultatet, vist i Figur 4.2, viser farging etter 96 timer da kinetikkstudiene viste likt resultat i alle tidsintervallene. Det ble i tillegg utført farging av hvilende T-celler, men resultatene var negative og er ikke vist i oppgaven.



Figur 4.2 T-celler ble stimulert med anti-CD3/CD28 partikler (3 partikler/prøve) og gikk 24 timer, 48 timer, 72 timer og 96 timer i kultur før de ble satt opp i nytt fargingsoppsett. Figur viser resultat etter 96 timer der det ble fordelt $2 \cdot 10^5$ celler/prøve. Følgende oppsett ble gjennomført: (1) Celler konjugert med GAM-IgG (kontroll), (2) anti-CD3-PE (0,4 µg/mL) og anti-CD56-FITC (10 µg/mL), (3) anti-C3aR-PE (2 µg/mL), og henholdsvis anti-CD3-FITC (0,4 µg/mL) i en prøve og anti-CD56-FITC (10 µg/mL) i en annen prøve, (4) anti-C5aR-PE (2,5 µg/mL) og henholdsvis anti-CD3-FITC (0,4 µg/mL) og anti-C56-FITC (10 µg/mL). Resultatet er representativt for to oppsett.

Resultatet av væskestrømcytometrianalysene viser at de fleste cellene etter nylonullfiltrering var CD3-positive. Det er likevel ca 6 % CD56-positive celler i kulturen, samt hele 15 % dobbeltpositive celler (CD3/CD56-positive). Farging av cellene med anti-CD56 og anti-C5aR viser at enkelte av de CD56-positive cellene er C5aR-positive. Farging av T-cellene med

anti-CD3 og anti-C5aR viser også celler som er positive for C5aR. Det er forøvrig stor sannsynlighet for at disse C5aR-positive cellene er de CD3/CD56-positive cellene, og altså er NK-celler. Det samme ser man ved farging med anti-C3aR. Resultatene ga derfor ikke evidens for ekspresjon av anafylatoksinreseptorer på T-celler. Figuren viser også en samling av partikler i sentrum, øvre venstre kvadrant. Dette er ikke celler, men rester av anti-CD3/CD28 partikler som ble brukt for å stimulere cellene.

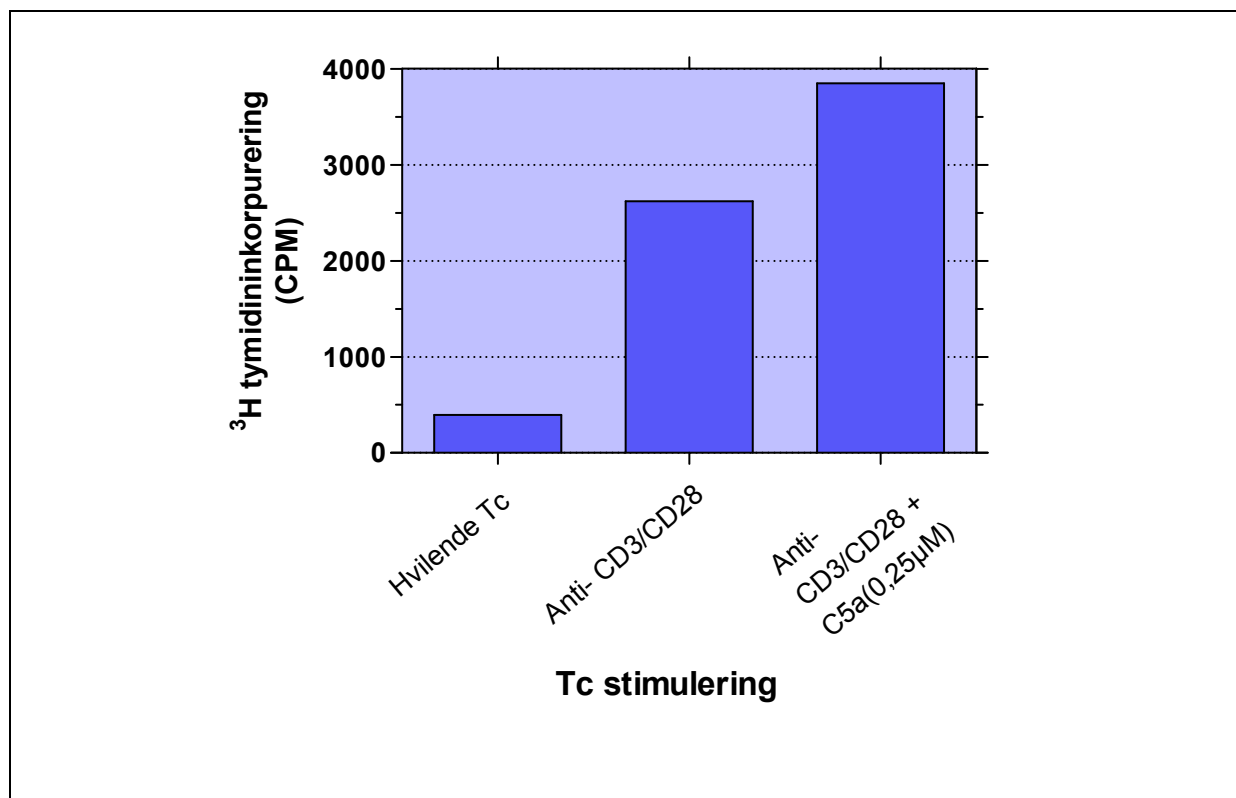
Det ble i tillegg utført væskestrømcytometrianalyser på Jurkat E.6.1 og MNC. Verken C5aR eller C3aR ble påvist på disse cellene. Resultat er ikke vist.

4.3 C5a og celleproliferasjon

RT-PCR resultatene påviste C5aR på mRNA-nivå i T-cellene. Væskestrømcytometrianalysene ga derimot ikke evidens for ekspresjon av proteinet i T-cellemembranen. Det kan derfor være hensiktsmessig å undersøke ekspresjon av C5aR på T-celler med funksjonelle testsystemer, som f.eks. T-celleproliferasjon. T-cellenes proliferasjon ble målt i nærvær og fravær av C5a. Man kan på denne måten undersøke om stimulering via C5aR gir signaler som påvirker T-celleaktivering og proliferasjon. Anafylatoksinet C3a ble fra dette punktet i oppgaven kuttet ut fordi C5a er et mer potent signalmolekyl, men også på grunn av begrenset tid.

4.3.1 Effekten av C5a på proliferasjon av anti-CD3/CD28 stimulerede humane T-celler

Det er tidligere vist at ekspresjon av C5aR øker ved stimulering av cellene opp til 60 timer (Nataf et al., 1999). Hvilende T-celler ble stimulert med anti-CD3/CD28, noe som induserte celleproliferasjon. Disse aktiverte cellene fikk gå i kultur til proliferasjonen sank og de igjen nådde hviletilstand. Deretter ble de analysert i et proliferasjonsassay. Disse cellene vil heretter bli referert til som nylig aktiverte T-celler.



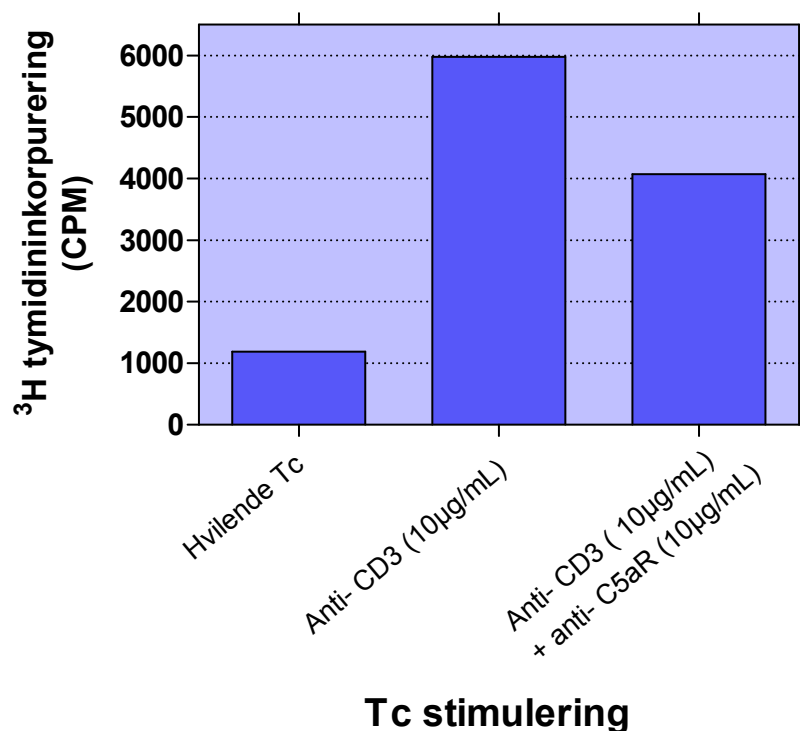
Figur 4.3 T-celler ble stimulert med anti-CD3/CD28 (3 partikler/celle) og gikk i kultur i 8-10 døgn. Det ble deretter fordelt 100 000 celler/prøve og prøvene forekom i triplikater. Første triplikat bestod av hvilende T-cellene (positiv kontroll). Neste triplikat ble stimulert med anti-CD3/CD28 partikler (3 partikler/celle), mens siste triplikat ble stimulert med anti-CD3/CD28 (3 partikler/celle) og C5a (0,25 μM). Resultatet er representativt for tre oppsett.

Figur 4.3 viser at samtidig C5a-stimulering har en positiv effekt på anti-CD3/CD28 induisert proliferasjon i T-celler.

Det ble i tillegg utført proliferasjonsanalyser på hvilende T-celler isolert fra perifert blod. I disse oppsettene fant vi ingen effekt av C5a på proliferasjonen. Resultat er ikke vist.

4.3.2 Effekten av anti-C5aR antistoffer på proliferasjon av anti-CD3 stimulerte humane T-celler

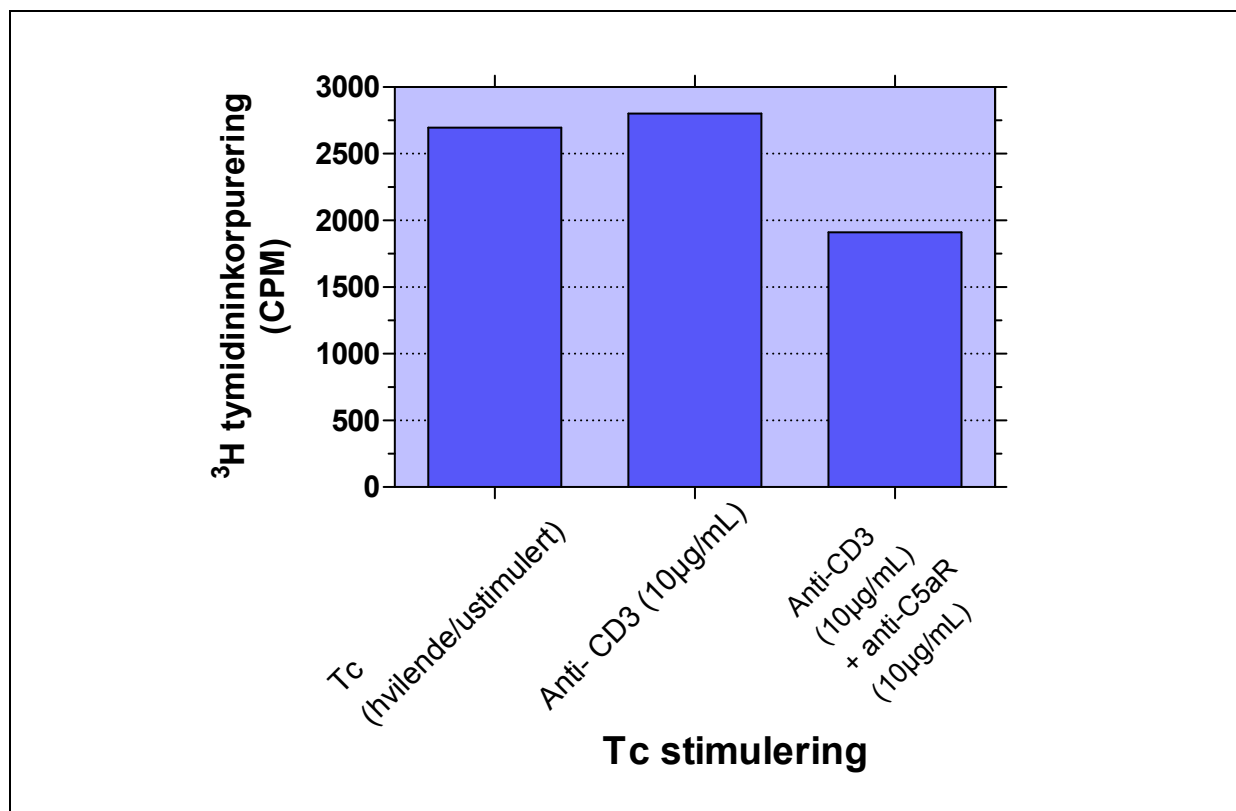
For å simulere to ligander som sitter på en fast fase, som overflaten på en celle, og for å undersøke om stimulering med antistoffer mot de to reseptorene (C5aR og TCR/CD3-komplekset) påvirket proliferasjon, ble proliferasjonen testet ved å stimulere med anti-C5aR antistoffer. Proliferasjonsanalysene ble først utført på hvilende celler, som ble direkte stimulert med antistoffene.



Figur 4.4 100 000 naive T-celler/prøve i tre triplikater. Første triplikat bestod av hvilende T-celler (kontroll). I andre triplikat ble cellene stimulert med anti-CD3 (10 µg/mL), mens i tredje triplikat ble cellene stimulert med anti-CD3 (10 µg/mL), samt anti-C5aR (10 µg/mL). Resultatet er representativt for to oppsett.

Proliferasjonen øker ved stimulering av cellene med anti-CD3. Vi finner derimot en nedgang i proliferasjon ved samtidig stimulering med anti-C5aR (Figur 4.4).

Hvilende celler ble i tillegg stimulert med anti-CD3/CD28 og gikk så i kultur til proliferasjonen sank og de inntok hvilende tilstand. Disse nylig aktiverte cellene ble så stimulert med antistoffer mot CD3 og/eller C5aR for å observere en eventuell påvirkning på proliferasjon.

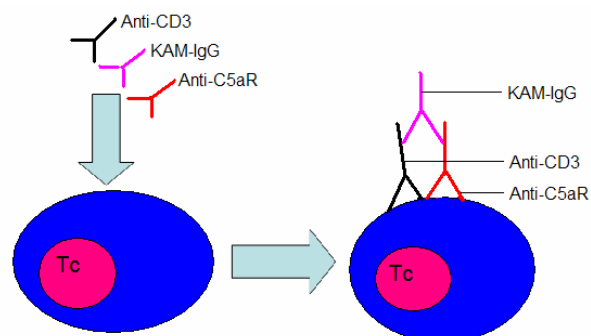


Figur 4.5 T-celler ble stimulert med anti-CD3/CD28 partikler (3 partikler/celle) og gikk 8-10 døgn i kultur før det ble fordelt 100 000 celler/prøve, og oppsett på tre triplikater. Første triplikat bestod av hvilende T-celler (kontroll). Neste triplikat ble stimulert med anti-CD3 (10 µg/mL), mens siste triplikat ble stimulert med anti-CD3 (10 µg/mL) sammen med anti-C5aR (10 µg/mL). Resultatene er representative for tre oppsett.

Resultatet (Figur 4.5) viser at cellene ikke har nådd hvilende tilstand etter den første stimuleringen, og at egenproliferasjonen i kontrollen derfor er meget høy. Dette vil maskere en eventuell effekt av anti-CD3 stimulering og medføre at det blir mindre forskjell i proliferasjon enn forventet. Man ser for øvrig lik tendens som hos de hvilende cellene i Figur 4.4; anti-C5aR stimulering reduserer proliferasjonen til cellene.

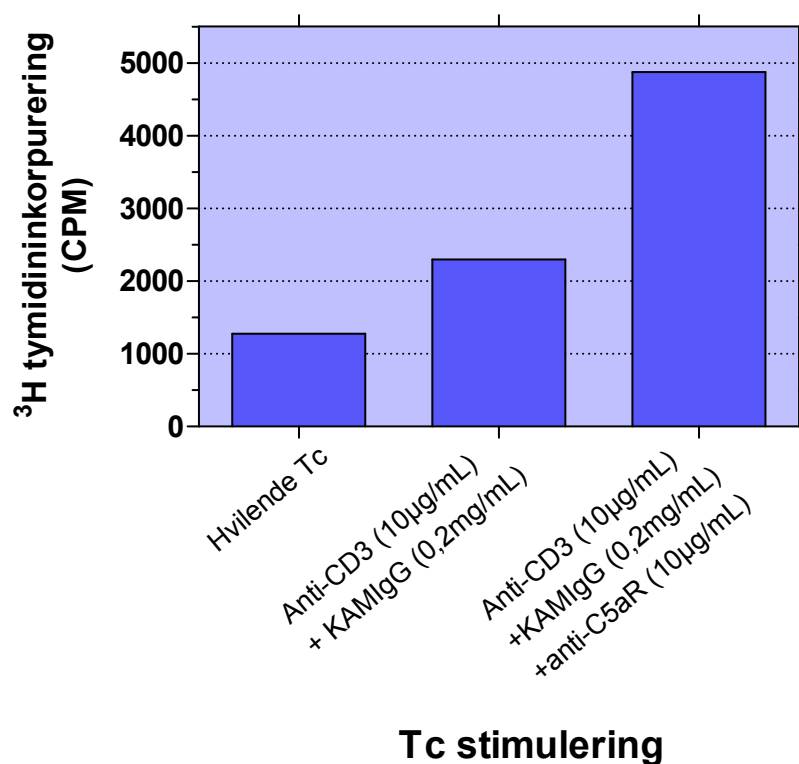
4.3.3 Effekten av C5aR på proliferasjon av hvilende og stimulerte humane T-celler i nærvær av anti-CD3 og KAM-IgG

I de tidligere proliferasjonsoppsettene (Figur 4.3 -Figur 4.5) ble det tilsatt stimuleringsagens som direkte bandt seg til cellene. Man kan i tillegg kryssbinde antistoffer for å utføre proliferasjonsanalyser der man danner en bro mellom stimuleringsantistoffene. I slike oppsett ser man om de to reseptorene samarbeider ved stimulering av cellen og proliferasjonsendringene avhenger dermed av flere proteiner, ikke kun C5a alene.



Figur 4.6 Kryssbinding av antistoffer i et proliferasjonsassay. T-celler blir stimulert med anti-CD3, KAM-IgG og anti-C5aR, der KAM-IgG fungerer som en bro mellom anti-CD3 og anti-C5aR.

Dette oppsettet ble utført på både hvilende celler, samt nylig aktiverte celler. Figur 4.7 viser kun resultatet fra stimulering av hvilende, naive celler, da de nylig aktiverte cellene ikke viste signifikant effekt etter kryssbinding av C5aR.



Figur 4.7 100 000 humane hvilende T-celler/prøve ble fordelt i tre triplikater. Første triplikat bestod av hvilende T-celler (kontroll). I neste triplikat ble T-cellene stimulert med anti-CD3 (10 µg/mL) i nærvær av KAM IgG (0,2 mg/mL). I siste triplikat ble T-celler stimulert med anti-CD3 (10 µg/mL), samt KAM IgG (0,2 mg/mL) og anti-C5aR (10 µg/mL). Resultatet er representativt for tre oppsett.

Vi ser av Figur 4.7 en liten økning i proliferasjon etter stimulering av cellene med anti-CD3. Kryssbinding av CD3 og C5aR med KAM IgG medfører der i mot en ytterligere økning i

proliferasjon. Dette viser en positiv effekt på proliferasjon av T-celler ved kryssbinding av TCR/CD3-komplekset med C5aR.

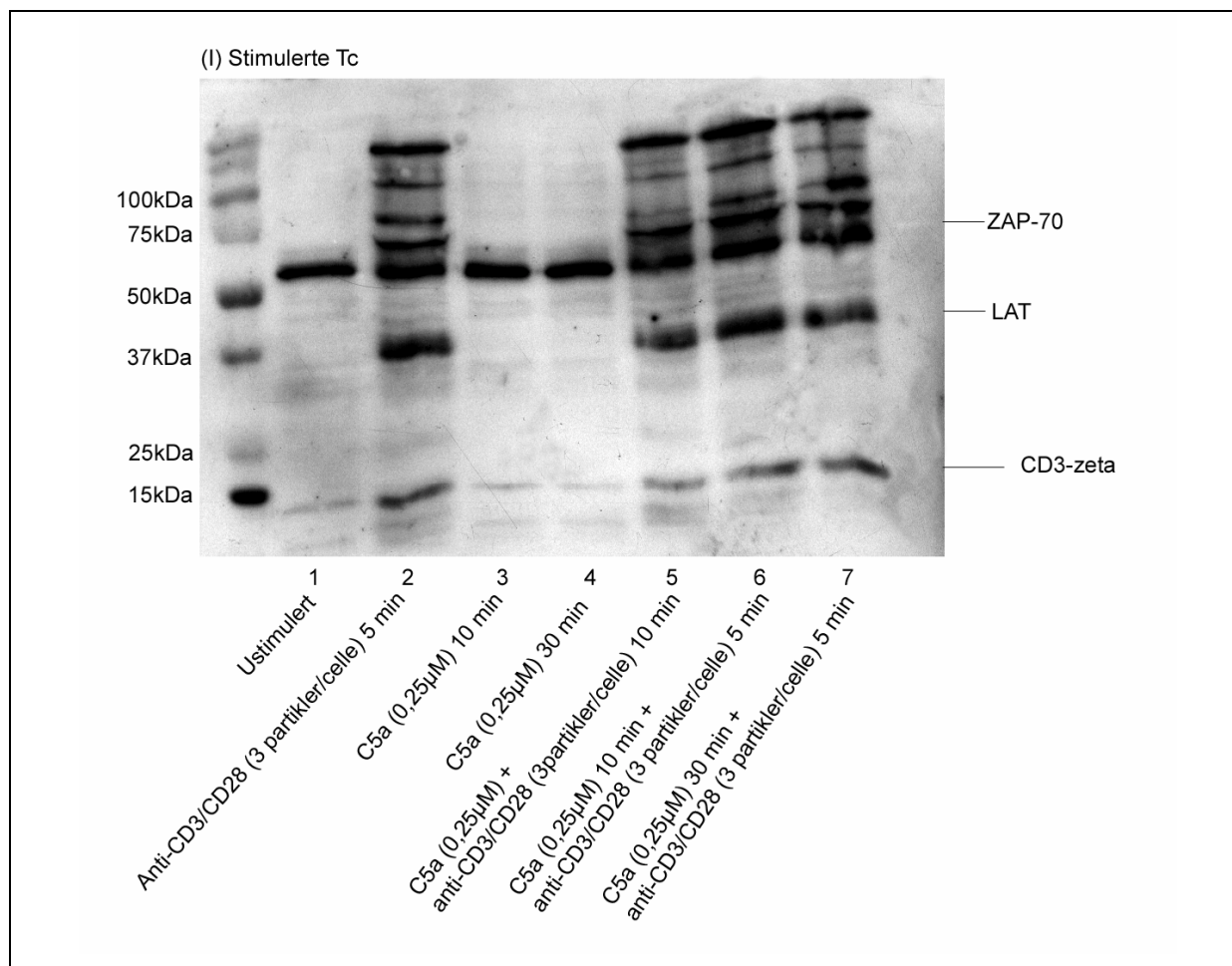
4.4 C5a og intracellulære signalveier i T-celler

Proliferasjonsanalysene viste at C5a og C5aR hadde både positiv og negativ effekt på T-celleproliferasjonen. Denne effekten gjenspeiler aktivering av cellens intracellulære signalveier. Aktivering av TCR/CD3-komplekset igangsetter nedstrøms signalveier, og en funksjonelt aktiv C5aR kan tenkes å påvirke denne aktiveringen. Med unntak av I κ B- α , ble det benyttet fosfospesifikke antistoffer som binder seg til spesifikke fosforylerte aminosyrer på signalmolekyler som kinaser og fosfataser. Ved tilstedeværelse av fosfatgrupper kan man si noe om aktiveringsstatusen til proteinet. På denne måten ble det undersøkt om C5a hadde noen effekt på tyrosinfosforylering, samt MAPK. I tillegg ble det undersøkt om C5a påvirket NF- κ B signalveien ved å studere virkning på I κ B- α ekspresjonen.

4.4.1 Effekten av C5a på tyrosinfosforylering i humane T-celler

Tyrosinfosforylering er en viktig hendelse i den tidlige delen av T-celleaktiveringsprosessen. Viktige signalmolekyler som tyrosinfosforyleres er bl.a. ζ -kjeden i CD3-komplekset, protein tyrosin kinasene p56lck, ZAP-70, samt adapterproteinet LAT, som igjen medfører aktivering av nedstrøms signalveier. T-celler ble aktivert gjennom TCR/CD3-komplekset i nærvær og fravær av C5a, samt aktivert med C5a alene for å se om dette påvirket tyrosinfosforyleringen.

Det ble innledende utført kinetikkstudier ved stimulering av TCR/CD3-komplekset i T-celler. Resultatene viste ingen forskjell i fosforylering mellom de forskjellige intervallene (resultat ikke vist).



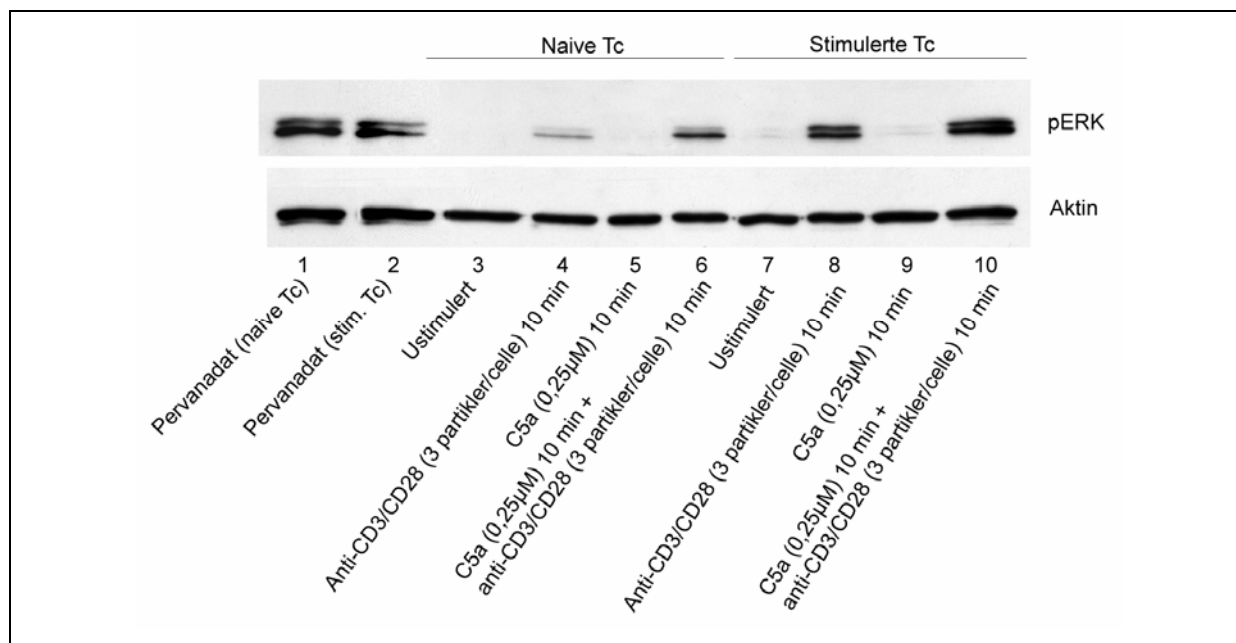
Figur 4.8 T-celler stimulert med anti-CD3/CD28 (3 partikler/celle) 7-8 døgn før prøveopparbeidelse. 5-10 mill T-celler/mL ble deretter stimulert med anti-CD3/CD28 (3 partikler/celle) og/eller C5a (0,25 μM). En prøve ble ikke stimulert (negativ/ustimulert kontroll). Det ble kjørt SDS-PAGE og Westernblot av prøvene før de inkuberte med primært antistoff 4G10 (0,8 μg/mL). Figuren er representativ for to oppsett.

Figur 4.8 viser hvilende T-celler, stimulert med anti-CD3/CD28 (3 partikler/celle), som deretter gikk i kultur i 7-8 døgn før de ble restimulert med anti-CD3/CD28 (3 partikler/celle) med eller uten C5a (0,25 μM). Etter prøveopparbeidelse ble prøvene kjørt på SDS-PAGE og det ble utført Westernblot som ble detektert med primær antistoffet 4G10 (0,8 μg/mL) som binder spesifikt til proteiner med fosforylerte tyrosin residuer.

Resultatet viser bl.a. fosforylering av ζ-kjeden i TCR/CD3 komplekset. Stimulering med C5a alene påvirker ikke tyrosinfosforylering og har ingen effekt på ζ-kjede fosforylering. Anti-CD3/CD28 stimulering og anti-CD3/CD28 stimulering kombinert med C5a-stimulering gir positiv tyrosinfosforylering og positiv CD3-ζ-fosforylering. Anti-CD3/CD28 stimulering av cellene kombinert med C5a øker ikke fosforyleringen sammenlignet med anti-CD3/CD28 stimulering alene.

4.4.2 Effekten av C5a på fosforylering av ERK i humane T-celler

ERK er en MAP-kinase som er involvert i regulering av T-celleproliferasjon og differensiering. Det er tidligere vist at C5aR aktiverer ERK i nøytrofile granulocytter (Buhl et al., 1995). For å undersøke om C5aR har samme effekt på ERK-fosforylering i T-celler, ble anti-CD3/CD28 induisert fosforylering av ERK undersøkt i nærvær og fravær av C5a for å observere mulige fosforyleringsendringer.



Figur 4.9 5-10 mill T-celler/mL ble stimulert (naive T-celler) eller restimulert (T-celler stimulerte 7-8 døgn med anti-CD3/CD28 (3 partikler/celle)) med anti-CD3/CD28 (3 partikler/celle) og/eller C5a (0,25 µM). Pervanadat-stimulering var positiv kontroll, ustimulert prøve var negativ kontroll. Anti-pERK ble benyttet som primært antistoff. Proteinmengde på membran ble sjekket ved å inkubere membran på nytt med anti-aktin antistoff. Resultatet er representativt for to oppsett.

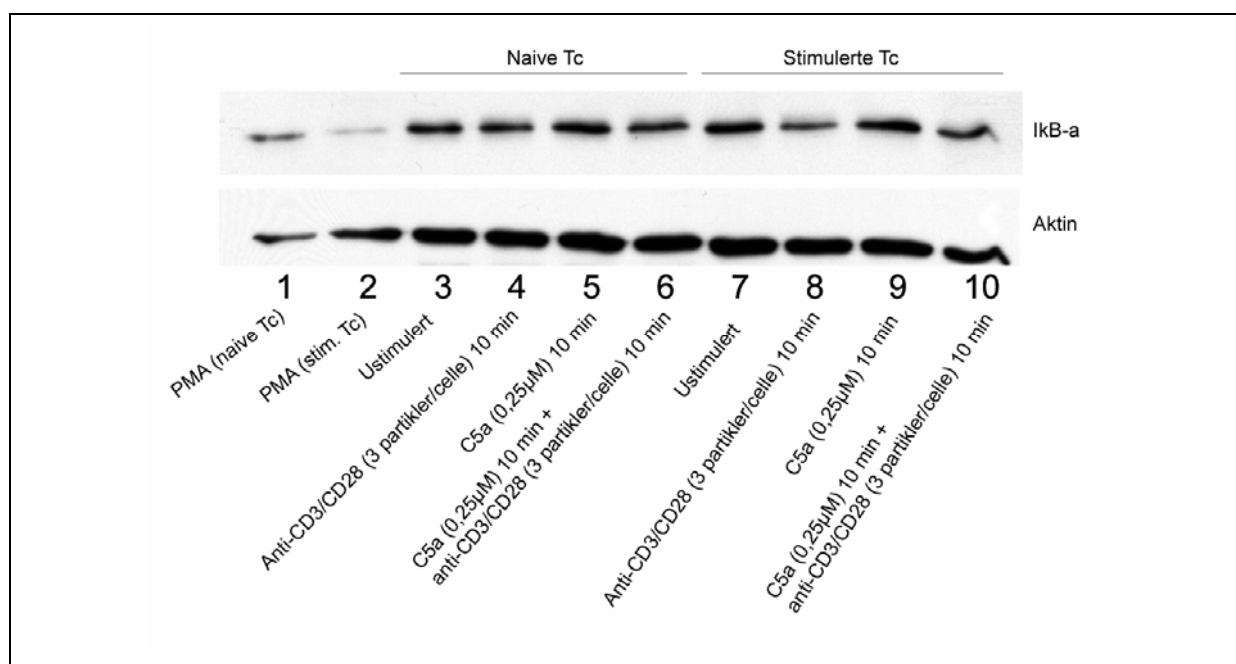
Figur 4.9 viser stimulering/restimulering av T-celler med anti-CD3/CD28 (3 partikler/celle) i nærvær og fravær av C5a (0,25 µM). I hvilende T-celler øker ERK1/2 fosforyleringen etter anti-CD3/CD28 stimulering. C5a påvirker ikke ERK1/2 fosforyleringen alene, men stimulering med anti-CD3/CD28 i nærvær av C5a gir en ytterligere økning i ERK1/2 fosforylering. Ved restimulering av T-celler med anti-CD3/CD28 ser man igjen at C5a ikke påvirker ERK1/2 fosforyleringen alene, men ved anti-CD3/CD28 restimulering i nærvær av C5a, øker ERK1/2 fosforyleringen i forhold til restimulering kun med anti-CD3/CD28.

Det finnes tre MAPK; ERK, JNK/SAPK og p38. Det ble undersøkt om C5a-stimulering av T-celler påvirket fosforylering av JNK/SAPK. Proteinene var imidlertid ikke tilstede i cellen og det

var umulig å detektere fosforyleringsendringer. Det ble derimot ikke utført forsøk på p38 da dette proteinet har vist seg å være vanskelig å detektere i T-celler.

4.4.3 Effekten av C5a på aktiviteten av I κ B- α i humane T-celler

I κ B- α fungerer som en proteininhibitor ved at den binder seg til og hemmer aktiviteten til transkripsjonsfaktoren NF- κ B (Baldwin, 1996). NF- κ B er en transkripsjonsfaktor som regulerer en rekke gener knyttet til utvikling av inflammatoriske prosesser. Siden C5a er et inflammatorisk molekyl, vil det være naturlig å anta en effekt av C5a på denne transkripsjonsfaktoren. For å oppnå aktivering av NF- κ B må I κ B- α brytes ned. PMA induserer NF- κ B aktivering og nedbryting av I κ B- α og ble derfor brukt som positiv kontroll for I κ B- α degradering. I κ B- α -nivåene ble undersøkt etter anti-CD3/CD28 (3 partikler/celle) induisert T-celleaktivering i nærvær og fravær av C5a (0,25 μ M).

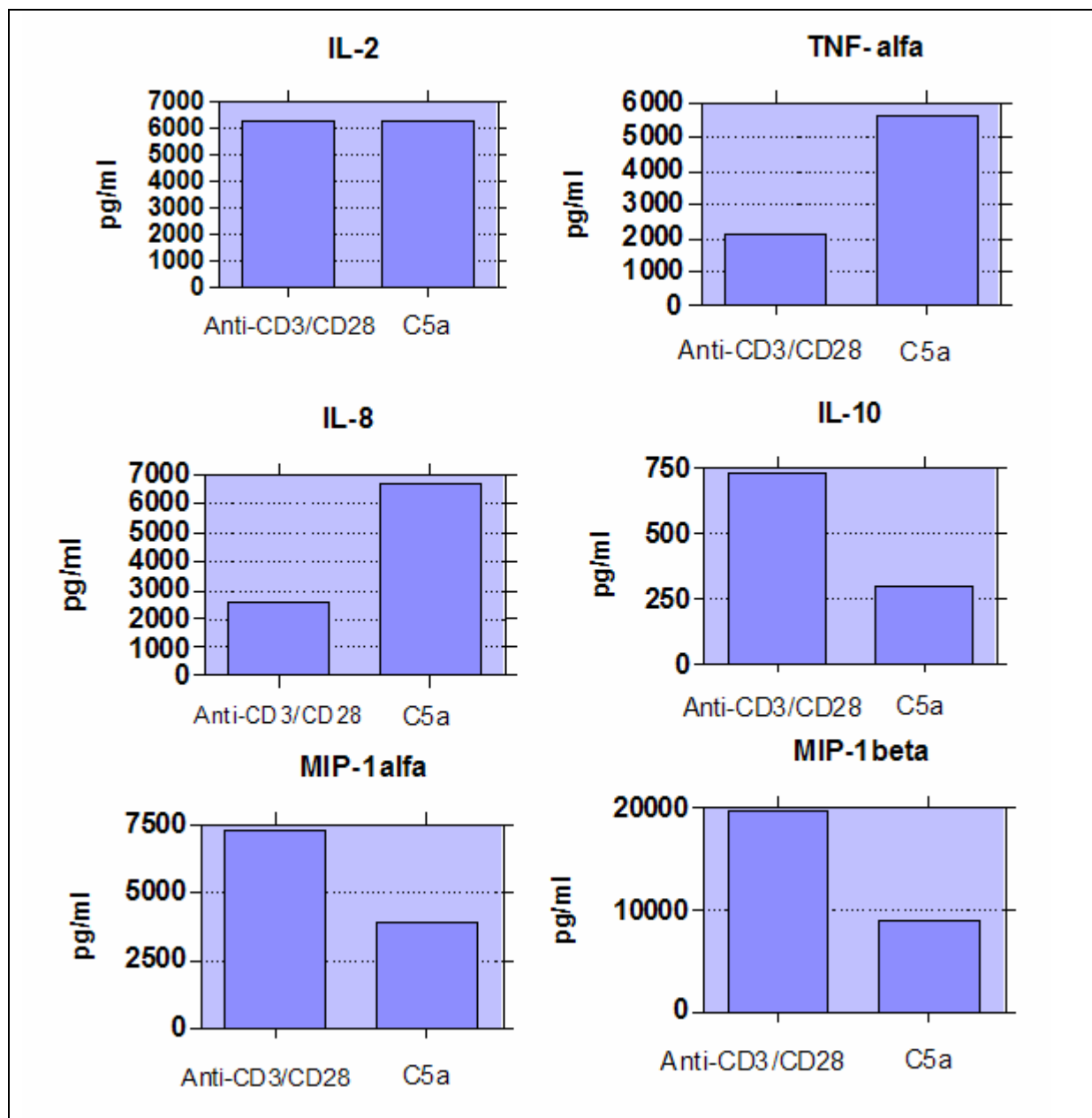


Figur 4.10 5-10 mill T-celler/mL ble stimulert (naive T-celler) og restimulert (T-celler stimulert 7-8 døgnet tidligere med anti-CD3/CD28 (3 partikler/celle)) med anti-CD3/CD28 (3 partikler/celle) og/eller C5a (0,25 μ M). PMA-stimulering var positiv kontroll, ustimulerte prøver var negativ kontroll. Etter SDS-PAGE og Westernblot ble membranen inkubert med I κ B- α antistoff og fremkalt. Membran ble deretter inkubert med anti-aktin. Resultatet er representativt for tre oppsett.

Figur 4.10 viser I κ B- α -nivåene i hvilende og aktiverte T-cellene. Celler stimulert med PMA viser som forventet en I κ B- α degradering. Man ser for øvrig ingen tydelig degradering etter anti-CD3/CD28 stimulering av cellene, heller ikke i nærvær av C5a.

4.5 C5a og cytokiner i humane T-celler

Aktivering av TCR/CD3-komplekset og videre aktivering av nedstrøms signalveier via signal 1 og signal 2 ender i produksjon av en rekke cytokiner. En eventuell funksjonelt uttrykt C5aR i T-cellemembranen vil kunne påvirke denne cytokinproduksjonen. Som nok en funksjonell undersøkelse av C5a-stimulering på T-celler ble C5aR-aktivering testet i forhold til cytokinproduksjon. Cytokinproduksjon fra humane T-celler indusert med anti-CD3/CD28 partikler (3 partikler/celle, 18 timer stimulering) ble sammenlignet med cytokinproduksjon fra T-celler stimulert med anti-CD3/CD28 (3 partikler/celle, 18 timer stimulering) i nærvær av C5a (0,25µM). Det ble utført analyse på 25 cytokiner: GM-CSF, IL-1β, IL-Rα, IL-6, IL-8, TNF-α, IFNγ, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-10, INF-α, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, eotaxin, IL-17, IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1α, MIP-1β og RANTES. Resultatet viser de 5 cytokinene med størst utslag på C5a-stimulering: TNF-α (pro-inflammatorisk cytokin), IL-8 (kjemokin), IL-10 (aktivering og cytokinproduksjon), MIP-1α (kjemokin) og MIP-1β (kjemokin). IL-2 påvirker proliferasjon og differensiering av T-celler. Utslaget av cytokinkvantiteringen på dette cytokinet ble derfor medberegnet i resultatet selv om C5a ikke viste effekt på produksjon av cytokinet. Resultatet av analysene vises i Figur 4.11.



Figur 4.11 Figuren viser utvalgte cytokiner analysert ved hjelp av humant cytokin 25 plex. Supernatant fra 10^6 humane T-celler stimulert med anti-CD3/CD28 partikler (3 partikler/celle) eller anti-CD3/CD28 i nærvær av C5a (0,25 μ M) i 18 timer.

Resultatet viser at C5a både har en inhiberende og stimulerende effekt på cytokinproduksjon i T-celler. Sammenligner man med anti-CD3/CD28 stimulering, har C5a-stimulering av T-celler ingen effekt på IL-2 produksjon, men en inhiberende effekt på cytokinene IL-10, MIP-1 α og MIP-1 β og en stimulerende effekt på de inflammatoriske cytokinene IL-8 og TNF- α .

5 DISKUSJON

Målet med oppgaven var å finne ut om humane T-celler uttrykker reseptorer for anafylatoksinene C5a og C3a og eventuelle funksjonelle konsekvenser av dette. Det går et fint skille mellom medfødt og ervervet immunforsvar og en eventuell påvisning av reseptorene på T-celler vil reflektere et bindeledd mellom disse to systemene. Innledende var det ønskelig å påvise reseptorene på mRNA-nivå. Dette ble utført ved hjelp av real time RT-PCR. Reseptorene ble deretter studert på proteinnivå, og det ble gjennomført væskestrømcytometrianalyser for å påvise uttrykk av reseptorene på overflaten av T-celler. Avsluttende ble det utført funksjonelle studier av reseptorene ved hjelp av proliferasjonsanalyser, Westernblot og cytokinkvantitering. Resultatet av analysene påviste tilstedeværelsen av reseptorene på mRNA-nivå. Væskestrømcytometrianalysene viste derimot ikke klart uttrykk av reseptorene i T-cellemembranen. Proliferasjonsanalysene viste at C5a både har positiv og negativ effekt på T-celleproliferasjon, mens cytokinkvantiteringen påviste effekt av C5a på utvalgte cytokiner. Ved Westernblotanalysene ble det påvist at C5aR aktiverer MAPK-signalerings og fører til ERK-fosforylering.

Med real time RT-PCR kan man gjøre en relativ kvantitering av mengde mRNA tilstede i en celleprøve. mRNA ble påvist for både C3aR og C5aR i både stimulerte T-celler og ustimulert Jurkat E6.1. Dette er i overensstemmelse med tidligere data der C5aR mRNA er påvist i både stimulerte T-celler og ustimulert Jurkat E6.1 (Nataf et al., 1999). Nataf et al. undersøkte ikke tilstedeværelsen av mRNA for C3aR. Dette er derimot utført av en annen gruppe, der det ble påvist mRNA for C3aR i stimulerte humane T-celler, men ikke i ferskt isolerte, naive T-celler (Werfel et al., 2000).

Det ble her i tillegg utført analyser der cellene ble undersøkt for mRNA for C5L2. Dette er de første studiene som undersøker forekomsten av C5L2 i T-celler og viser for første gang at T-celler ikke inneholder C5L2. Flere celletyper fra medfødt immunitet (granulocytter og umodne dendritiske celler (Ohno et al., 2000)) uttrykker denne reseptoren, og resultatet viser derfor at T-celler skiller seg fra en del andre immunceller. Primerne benyttet i denne oppgaven har påvist mRNA for C5L2 i andre celletyper. Dette tilsier at disse primerne var optimale. Det negative resultatet kan derimot ha sammenheng med at det befinner seg så liten mRNA for C5L2 i cellene at det ikke lar seg detektere.

Det ble deretter utført væskestrømcytometrianalyser for å forsøke å påvise ekspresjon av C5aR og C3aR i T-cellemembranen. Undersøkelsene ga ikke evidens for at reseptorene var uttrykt på hele T-cellepopulasjonen. Verken hvilende, ferskt isolerte T-celler, eller aktiverte T-

celler påviste uttrykk. Dette er i motsetning til hva som er rapportert tidligere (Nataf et al., 1999).

Det ble benyttet nylonfiltrerte celler som testsystem. Fjerning av adherente celler ved filtrering gjennom nylonull er en uspesifikk fraksjoneringsmetode som ikke nødvendigvis innebærer at de ikke-adherente cellene representerer en homogen T-cellepopulasjon. Den ikke-homogene T-cellefraksjonen kan derfor inneholde andre celletyper. NK-celler dannes fra den lymfoide cellerekken og har derfor enkelte likhetstrekk med T-celler. I motsetning til T-celler tilhører NK-celler medfødt immunitet. Det er påvist anafylatoksinreseptorer på flere celler tilhørende medfødt immunitet. Siden NK-cellene tilhører medfødt immunitet, kan det tenkes at NK-celler uttrykker de to anafylatoksinreseptorene. Det ble derfor undersøkt om den ikke-homogene T-cellefraksjonen inneholdt disse cellene. Prøvene ble farget med spesifikke markører for de to celletypene; CD3 som markør for T-celler og CD56 som markør for NK-celler. Fargingsoppsettene viste forekomst av ca. 6 % CD56-positive celler og ca. 78 % CD3-positive celler. En del av cellene var i tillegg positive for både CD3 og CD56 (15 %). Et lite antall (1-2 %) CD56-positive celler var positive for både C5aR og C3aR. Dette viste seg også for de CD3-positive cellene. Men på grunn av det høye antallet CD3/CD56-positive celler, var det større sannsynlighet for at de C5aR- og C3aR-positive cellene tilhørte de CD3/CD56-positive cellene. De dobbeltpositive (CD3/CD56-positive) cellene reflekterer ikke de typiske T-cellene. Oppsettene ga ingen klare bevis for uttrykk av reseptorene i T-cellemembranen. Dette negative utfallet kan henge sammen med at antistoffene som ble benyttet ikke var optimale. Det kan også skyldes at reseptorene er uttrykt i så lave konsentrasjoner at de er vanskelige å påvise.

Observasjonene gjort ved væskestrømcytomtrianalysene betyr imidlertid ikke at reseptorene ikke kan være tilstede og av funksjonell betydning. Dette dannet bakgrunn for å utføre funksjonelle studier og det ble undersøkt om C5a-stimulering påvirket T-celleproliferasjon. T-celler ble først stimulerte med anti-CD3/CD28 i nærvær og fravær av løselig C5a. Alle proliferasjonsanalysene ble utført på hvilende celler. Det ble likevel gjort to forskjellige T-celleoppsett. Noen av cellene ble aktivert *in vitro*, slik at celleproliferasjon ble igangsatt. Cellene gikk opp mot 10 døgn i kultur. I løpet av denne perioden gikk proliferasjonen ned og cellene inntok hvilende tilstand igjen. På denne måten fikk man undersøkt nylig aktiverte, men hvilende T-celler. Disse cellene viste økt proliferasjon ved anti-CD3/CD28-stimulering i nærvær av løselig C5a. I det andre oppsettet ble hvilende, ferskt isolerte T-celler stimulert direkte med anti-CD3/CD28 i nærvær og fravær av C5a. Her så man derimot ingen signifikant proliferasjonspåvirkning ved anti-CD3/CD28-stimulering i nærvær av C5a. Resultatet viste derfor at C5a økte T-celleproliferasjonen til nylig aktiverte, hvilende T-celler, mens C5a viste ingen påvirkning på proliferasjonen ved stimulering av ferskt isolerte,

hvilende T-celler. Dette kan indikere at T-cellene må aktiveres før C5a kan gi noen funksjonell effekt. Disse resultatene danner imidlertid ikke nok grunnlag til å trekke en slik konklusjon. Det er samtidig viktig å være klar over at det i flere tilfeller viste seg at cellene hadde høy egenproliferasjon. Det vil si at cellene ikke hadde inntatt hvilende tilstand. Dette kan maskere en effekt av tilsatt stimuli og påvirke proliferasjonsmålingen.

Cellene ble deretter stimulert med antistoffer mot reseptorene: C5aR og TCR/CD3-komplekset, for å undersøke om disse stimuleringsbetingelsene påvirket proliferasjonen av cellene i annen retning enn løselig C5a gjorde. Stimulering med anti-CD3 i nærvær av anti-C5aR av både ferskt isolerte, hvilende celler og nylig aktiverte, hvilende celler viste en nedgang i T-celleproliferasjon. Dette samsvarer ikke med resultatet C5a-ligandstimulering viste på nylig aktiverte, hvilende T-celler. Dette kan forklares med at antistoffene binder seg til andre deler av reseptoren eller med forskjellig affinitet sammenlignet med den aktuelle liganden. Nylig aktiverte T-celler viste i tillegg høy egenproliferasjon i akkurat dette oppsettet. Dette betyr at nedgangen i proliferasjonen ikke har vært tilstrekkelig til at de cellene har nådd hvilende tilstand igjen og som forklart over kan dette påvirke proliferasjonsmålingene.

Det ble også utført forsøk med kryssbinding av de to reseptorene (C5aR og TCR/CD3-komplekset), for å undersøke om dette hadde noen funksjonell konsekvens. Dette oppsettet viste ingen signifikant effekt på proliferasjonen til nylig aktiverte, hvilende T-celler, mens ferskt isolerte, hvilende celler viste økt proliferasjon ved kryssbinding. Økningen i proliferasjonen på hvilende celler kan indikere at stimulering via C5aR påvirker stimulering gjennom TCR/CD3-komplekset i T-celler. Samlet kan proliferasjonsdataene både med C5a og antistoffer gi en viss evidens for at det er uttrykt funksjonelle C5a reseptorer på T-celler.

Det ble også utført funksjonelle studier knyttet til cytokinfrigjøring i T-celler ved C5a-stimulering. Et panel med 25 cytokiner ble undersøkt. Flertallet av disse viste ingen respons på C5a-stimulering, men det ble funnet økt produksjon av både IL-8 og TNF- α . IL-8 aktiverer neutrofile granulocytter, øker cytosolisk Ca²⁺-nivå i neutrofiler og frigjør enzymer fra granula, samt har kjemotaktisk effekt. Det pro-inflammatoriske cytokinet TNF- α fungerer blant annet som en kjemoattraktant for neutrofiler, øker proliferasjon av T-celler og fremmer proliferasjon og differensiering av B-celler (Ibelgauf, 2007). C5a-stimulering av T-celler kan på denne måten påvirke enkelte eller flere av disse systemene. IL-8 induisert syntese etter C5a-stimulering av monocytter er påvist tidligere (Ember et al., 1994), mens produksjon av TNF- α er påvist etter C5a-stimulering av humane MNC (Okusawa et al., 1988). Nivåene av IL-10, MIP-1 α og MIP-1 β viste reduksjon etter C5a-stimulering. IL-10 inhiberer blant annet produksjon av en rekke andre cytokiner, samt hemmer antigen presentasjon. MIP-1 α og MIP-1 β gir lokal inflammatorisk respons og medfører økt produksjon av neutrofiler (Ibelgauf,

2007). C5a-stimulering kan derfor hemme enkelte eller flere av disse faktorene. Det er ikke tidligere vist at IL-10- eller MIP-1 α/β -produksjon påvirkes etter C5a-stimulering.

Det er ikke tidligere dokumentert at C5a påvirker cytokinfrigjøring i T-celler, men det har blitt rapportert at C5a påvirker cytokinfrigjøring i andre celletyper enn T-celler. Monsinjon et al. har vist at C5a og C3a oppregulerer produksjonen av flere cytokiner i human umbilical cord endothelial cells (HUVEC) (Monsinjon et al., 2003). Det er også flere rapporter som viser effekt av C5a-signalerings på proinflammatoriske cytokingener i MNC fra perifert blod, deriblant IL-1 β , IL-6, IL-8 og TNF- α (Ember et al., 1994; Goodman et al., 1982; Okusawa et al., 1987; Okusawa et al., 1988; Pan, 1998; Schindler et al., 1990). Resultatene i denne oppgaven indikerer at C5a-stimulering av T-celler medfører effekt på enkelte proinflammatoriske cytokiner og kjemokiner.

Siden det ble påvist effekt på proliferasjon, ble det utført forsøk for å avklare om C5a påvirket tidlige tyrosinfosoryleringshendelser, MAPK aktivering og NF- κ B aktivering. Det er ikke tidligere rapportert effekt via C5aR på disse systemene i T-celler.

Det ble undersøkt om C5a-stimulering av T-celler påvirket tyrosinfosoryleringsmønsteret i cellene. Dette viste at ζ -kjeden i CD3-komplekset ble aktivert, altså aktivert TCR/CD3-kompleks ved anti-CD3/CD28-stimulering av cellene. Dette viser at cellene responderte på stimuleringen og hadde intakt aktiveringsmekanisme. Resultatene viste derimot ingen effekt av C5a-stimulering på verken ζ -kjeden eller tyrosinfosoryleringsmønsteret generelt. Man kan fra dette konkludere med at C5aR ikke påvirker denne tidlige aktiveringshendelsen.

MAPK signalerings kan deles i tre: ERK 1/2, p38 og JNK/SAPK. Resultatene i denne oppgaven viste at C5a-stimulering av T-celler gir økt ERK-fosorylering i T-celler. T-celler ble stimulert med anti-CD3/CD28 med og uten C5a. Resultatet viste at samtidig stimulering gjennom TCR/CD3-komplekset og C5aR økte ERK 1/2 fosoryleringen i cellene. Dette ble vist i både hvilende, ferskt isolerte T-celler og aktiverte T-celler. Disse dataene indikerer en kobling mellom C5aR og Ras-Raf-MEK-ERK regulering i T-celler.

Det ble i tillegg undersøkt JNK/SAPK aktivering i respons på C5a-stimulering av T-celler. Fosorylert JNK kunne ikke påvises og fremkalling av Westernblottet med anti-JNK antistoffer viste at denne MAP kinasen ikke kunne påvises i T-celle lysatene. Dette indikerer at T-cellene ikke inneholdt JNK/SAPK-proteinet. For å bekrefte denne antagelsen ble blottet inkuberte med antistoffer mot aktin, som bekreftet tilstedeværelse av proteiner på Westernblottet. Utfra dette ble det konkludert med at JNK/SAPK ikke er uttrykt i cellene og det var derfor ikke mulig å si noe om effekten av C5a på denne MAP kinasen. Det ble forsøkt å forlenge eksponeringstiden uten at dette hadde noe resultat. Man kunne eventuelt prøvd ut høyere konsentrasjoner av spesielt anti-JNK antistoffet for eventuelt å detektere proteinet.

Det burde i tillegg vært prøvd ut et alternativt antistoff for å utelukke eventuelle feil ved preparatet. Det ble ikke utført forsøk på stimulering av T-celler via p38 signalveien i denne oppgaven da det er erfart dårlige resultater på T-cellestimulering via denne signalveien tidligere.

Det er tidligere vist at C5a signaliserer via MAPK i humane neutrofiler (Buhl et al., 1994). Sayah et al. undersøkte C5a-stimulering av astrocytter hos rotte og konkluderte med at C5a både aktiverte både PKC og MAPK, samt senket cAMP-nivået i cellen (Sayah et al., 2003). I 2003 ble det publisert data fra studier av neutrofiler hos rotte, der det ble påvist positiv C5a effekt på lipopolysakkarid (LPS) aktivering av alle tre MAPK signalveiene (Riedemann et al., 2003). Det er videre vist at C5a og C3a aktiverer MAPK signalering via ERK kinasene i HUVEC (Monsinjon et al., 2003).

Det er påvist at C5a kan føre til reduserte cAMP-nivåer i Jurkat E6.1 (C. Kleiveland, upubliserte data). Dette tyder på at C5aR kan være Gi-koblet også i T-celler. C5aR er påvist uttrykt på flere celler av den myeloide cellerekke. Rollins et al. viste i 1991 at i humane polymorfonukleære leukocytter er C5aR koblet til et heterotrimerisk G-protein som aktiverer α -subenheten ($G_{i\alpha 2}$) (Rollins et al., 1991). Denne inhibitoriske G-proteinsubenheten ($G_{i\alpha 2}$) fungerer ved å inhibere adenylyl cyclase (AC), noe som medfører reduserte cAMP-nivåer i cellen (Albert B., 2002). Studier på humane Ltk⁻ (leukocyt tyrosin kinase-negative) celler har vist at den negative effekten på AC fører til stimulering av PI-PLC (fosfoinositid spesifikk fosfolipase C) (Shum et al., 1995).

Cytokinet IL-2 påvirker proliferasjon og differensiering av T-celler. Cytokinanalysene viste derimot ingen effekt av C5a-stimulering på IL-2 produksjon i T-celler. Siden IL-2 produksjonen ikke ble berørt, vil dette si at proliferasjonsendringene etter C5a-stimulering må gå via et annet system enn IL-2-nivåene i cellen. Det er tidligere publisert at MAP kinasen ERK reguleres av cAMP-nivåer og PKA i T-celler (Ramstad et al., 2000). Thomas Mustelin har også vist at ERK2 reguleres av den PKA-avhengig fosfatasen HePTP (Saxena et al., 1998). I og med at C5a-stimulering viser en negativ effekt på cAMP i Jurkat-celler (C. Kleiveland, upublisert data) og økt cAMP hemmer ERK-fosforylering i T-celler, vil et senket cAMP-nivå i cellen kunne forklare den økte ERK-fosforyleringen i T-celler ved C5a-stimulering. Denne C5a-induserte økningen av ERK-fosforylering i T-celler kan videre gjenspeile den økte celleproliferasjonen i respons på C5a-stimulering. Dette beskriver et alternativt system som påvirker celleproliferasjonen ved C5a-stimulering enn IL-2-nivåene i cellen. Det er samtidig viktig å være klar over at ³H thymidininkorporering gir informasjon om total DNA syntese. Det at proliferasjonsanalysene viser økt thymidininkorporering behøver ikke bety annet enn at flere celler starter celledyklus. Årsaken til dette kan ha sammenheng

med at flere celler uttrykker tilstrekkelig med høyaffinitets IL-2R til at de kan gå inn i cellesyklus uten at dette krever økning i IL-2 produksjonen.

Som forklart over oppsto det ingen effekt på proliferasjonen hos ferskt isolerte, hvilende cellene stimulert i nærvær av C5a. Det ble derimot påvist økt fosforylering av ERK på de samme cellene. Dette indikerer ekspresjon av funksjonelt uttrykt C5aR på ferskt isolerte, hvilende celler. Det er kjent at ERK-fosforylering har effekt på T-celleproliferasjon og differensiering. Disse resultatene viser derimot at ferskt isolerte, hvilende celler får økt ERK-fosforylering ved C5a-indusert stimulering, men at dette ikke medfører økt celleproliferasjon. Denne studien gir ikke nok informasjon til å kunne trekke noen konklusjon om de molekylære mekanismene bak disse observasjonene.

Mange inflammatoriske signalmolekyler aktiverer NF- κ B signalveien. C5aR er et molekyl som er knyttet til betennelsesreaksjoner. I denne oppgaven ble det ikke påvist effekt på I κ B- α nivåene i T-celler og derfor heller ikke påvist NF- κ B aktivering i cellene. Det er ikke dokumentert at C5a-stimulering av T-celler kan gi NF- κ B translokasjon til kjernen. Det er derimot vist at rekombinant C5a aktiverer PKC i humane neuroblastomaceller, noe som fører til translokasjon av NF- κ B til kjernen (O'Barr et al., 2001). Tidligere er det også vist at C5a og C3a induserer NF- κ B aktivering i humane monocytter fra perifert blod (Pan, 1998). Grunnet anafylatoksinenes rolle i inflammasjonsreaksjoner var det ventet enn effekt av C5a-stimulering på denne signalveien. Det burde derfor utføres nye forsøk der NF- κ B aktivering undersøkes med andre metoder enn I κ B- α degradering.

5.1 Konklusjon og videre arbeid

Kort oppsummert ble det i denne oppgaven bekreftet at T-celler inneholder mRNA for både C5aR og C3aR. Det ble samtidig vist at T-celler ikke inneholder mRNA for C5L2. Videre ble det registrert en økning i T-celleproliferasjon ved C5a-indusert stimulering av cellene, samt påvist at den C5a-indusert stimuleringen regulerer frigjøring av enkelte cytokiner. For første gang påvises det at C5a-stimulering av T-celler øker ERK-fosforyleringen i cellene. Den økte ERK-fosforyleringen kan skyldes redusert cAMP-nivå ved C5a-stimulering.

Følgende punkter kan være av interesse for videre arbeid:

- Siden IL-2 nivåene i cellen ikke endret seg ved C5a-stimulering, kan man undersøke hva som forårsaker den økte proliferasjonen av cellene. Testsystemet (^3H thymidininkorporering) som ble benyttet i denne oppgaven måler kun total DNA syntese. Dette gir ikke svar på om den økte proliferasjonen skyldes flere aktiverte celler eller om C5a medfører en raskere cellesyklusgjennomgang. Det bør derfor gjennomføres cellesyklusanalyser for å undersøke dette nærmere.
- Man kan også se på hvilke effekter økt ERK-fosforylering gir. ERK aktiverer blant annet transkripsjonsfaktoren AP-1 (Karin, 1995). Dersom man transfektere inn et reporterkonstrukt som inneholder promotoren for AP-1 binding, kan man undersøke om den økte ERK-fosforyleringen gir økt transkripsjon fra AP-1 promotoren.
- AP-1 finnes blant annet i promotoren til IL-2 genet. Det kan derfor være av interesse å undersøke om C5a-stimulering av T-celler påvirker andre gener som reguleres av transkripsjonsfaktoren AP-1.
- Undersøkelse av I κ B- α nivåer i T-celler etter C5a-stimulering er kun en måte å undersøke tilstedeværelse av NF- κ B signalering i cellene. Det finnes flere andre testsystemer for NF- κ B aktivering. Man kan for eksempel se på promotorregionen NF- κ B binder til. Ved å sette inn et reportergen etter denne promotorregionen, vil aktivert NF- κ B føre til transkripsjon av reportergen. Reportergen kan deretter detekteres ved hjelp av farge, fluorescens eller luminisens.

6 LITTERATURLISTE

Albert B., J.A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002). Molecular Biology of The Cell, fourth edition edn (United States of America, Garland Science, a member of the Taylor and Francis Group).

Ali, H., and Panettieri, R.A. (2005). Anaphylatoxin C3a receptors in asthma. Respiratory Research 6.

Ames, R.S., Li, Y., Sarau, H.M., Nuthulaganti, P., Foley, J.J., Ellis, C., Zeng, Z.Z., Su, K., Jurewicz, A.J., Hertzberg, R.P., *et al.* (1996). Molecular cloning and characterization of the human anaphylatoxin C3a receptor. Journal of Biological Chemistry 271, 20231-20234.

AppliedBiosystems (2006). SYBR®Green PCR and RT-PCR Reagents, http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041000.pdf

Ashwell, J.D., Defranco, A.L., Paul, W.E., and Schwartz, R.H. (1984). Antigen Presentation by Resting B-Cells Radiosensitivity of the Antigen-Presentation Function and 2 Distinct Pathways of T-Cell Activation. Journal of Experimental Medicine 159, 881-905.

Baldwin, A.S. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: New discoveries and insights. Annual Review of Immunology 14, 649-683.

Berman, D.M., and Gilman, A.G. (1998). Mammalian RGS proteins: Barbarians at the gate. Journal of Biological Chemistry 273, 1269-1272.

Beverley Wilkinson, J.S.D.a.C.E.R. (2005). T-cell signalling and immune system disorders. Expert reviews in Molecular Medicine, <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=362721#>.

BioRadLaboratories (2006). MiniPROTEAN®3Cell, http://www.bio-rad.com/cmc_upload/Literature/44432/4006157B.pdf.

Bluestone, J.A., Matthews, J.B., and Krensky, A.M. (2000). The Immune Tolerance Network: The "Holy Grail" comes to the clinic. Journal of the American Society of Nephrology 11, 2141-2146.

Boulay, F., Mery, L., Tardif, M., Brouchon, L., and Vignais, P. (1991). Expression Cloning of a Receptor for C5a Anaphylatoxin on Differentiated HL-60 Cells. Biochemistry 30, 2993-2999.

Brondello, J.M., Pouyssegur, J., and McKenzie, F.R. (1999). Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44(MAPK)-dependent phosphorylation. Science 286, 2514-2517.

Buhl, A.M., Avdi, N., Worthen, G.S., and Johnson, G.L. (1994). Mapping of the C5a Receptor Signal-Transduction Network in Human Neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9190-9194.

Buhl, A.M., Osawa, S., and Johnson, G.L. (1995). Mitogen-Activated Protein-Kinase Activation Requires 2 Signal Inputs from the Human Anaphylatoxin C5a Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 270, 19828-19832.

Cain, S.A., and Monk, P.N. (2002). The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). *Journal of Biological Chemistry* 277, 7165-7169.

Chan, A.C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G.H., Wang, T., Thoma, R., and Kurosaki, T. (1995). Activation of Zap-70 Kinase-Activity by Phosphorylation of Tyrosine-493 Is Required for Lymphocyte Antigen Receptor Function. *Embo Journal* 14, 2499-2508.

Chang, L.F., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.

Chao, T.H., Ember, J.A., Ember, J.A., Wang, M.Y., Bayon, Y., Hugli, T.E., and Ye, R.D. (1999). Role of the second extracellular loop of human C3a receptor in agonist binding and receptor function. *Journal of Biological Chemistry* 274, 9721-9728.

Chen, N.J., Mirtsos, C., Suh, D., Lu, Y.C., Lin, W.J., McKerlie, C., Lee, T., Baribault, H., Tian, H., and Yeh, W.C. (2007). C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. *Nature* 446, 203-207.

Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. (1995). How Map Kinases Are Regulated. *Journal of Biological Chemistry* 270, 14843-14846.

Crass, T., Raffetseder, U., Martin, U., Grove, M., Klos, A., Kohl, J., and Bautsch, W. (1996). Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor (C3aR) from differentiated U-937 cells. *European Journal of Immunology* 26, 1944-1950.

DeSilva, D.R., Jones, E.A., Favata, M.F., Jaffee, B.D., Magolda, R.L., Trzaskos, J.M., and Scherle, P.A. (1998). Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy. *Journal of Immunology* 160, 4175-4181.

Dommett, R.M., Klein, N., and Turner, M.W. (2006). Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 68, 193-209.

Dornan, S., Sebestyen, Z., Gamble, J., Nagy, P., Bodnar, A., Alldridge, L., Doe, S., Holmes, N., Goff, L.K., Beverley, P., *et al.* (2002). Differential association of CD45 Isoforms with CD4 and CD8 regulates the actions of specific pools of p56(lck) tyrosine kinase in T cell antigen receptor signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 277, 1912-1918.

Egerton, M., Fitzpatrick, D.R., Catling, A.D., and Kelso, A. (1996). Differential activation of T cell cytokine production by the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *European Journal of Immunology* 26, 2279-2285.

Ember, J.A., Sanderson, S.D., Hugli, T.E., and Morgan, E.L. (1994). Induction of Interleukin-8 Synthesis from Monocytes by Human C5a Anaphylatoxin. *American Journal of Pathology* 144, 393-403.

Falk, W., and Leonard, E.J. (1980). Human Monocyte Chemotaxis - Migrating Cells Are a Sub-Population with Multiple Chemotaxin Specificities on Each Cell. *Infection and Immunity* 29, 953-959.

Frank, M.M., and Fries, L.F. (1991). The Role of Complement in Inflammation and Phagocytosis. *Immunology Today* 12, 322-326.

Franklin, R.A., Tordai, A., Patel, H., Gardner, A.M., Johnson, G.L., and Gelfand, E.W. (1994). Ligation of the T-Cell Receptor Complex Results in Activation of the Ras/Raf-1/Mek/Mapk Cascade in Human T-Lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation* 93, 2134-2140.

Fung, M.M., Rohwer, F., and McGuire, K.L. (2003). IL-2 activation of a PI3K-dependent STAT3 serine phosphorylation pathway in primary human T cells. *Cellular Signalling* 15, 625-636.

Gao, H.W., Neff, T.A., Guo, R.F., Speyer, C.L., Sarma, J.V., Tomlins, S., Man, Y.F., Riedemann, N.C., Hoesel, L.M., Younkin, E., *et al.* (2005). Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. *Faseb Journal* 19, 1003-+.

Gavrilyuk, V., Kalinin, S., Hilbush, B.S., Middlecamp, A., McGuire, S., Pelligrino, D., Weinberg, G., and Feinstein, D.L. (2005). Identification of complement 5a-like receptor (C5L2) from astrocytes: characterization of anti-inflammatory properties. *Journal of Neurochemistry* 92, 1140-1149.

Gerard, N.P., and Gerard, C. (1991). The Chemotactic Receptor for Human-C5a Anaphylatoxin. *Nature* 349, 614-617.

Gerard, N.P., Lu, B., Liu, P.X., Craig, S., Fujiwara, Y., Okinaga, S., and Gerard, C. (2005). An anti-inflammatory function for the complement anaphylatoxin C5a-binding protein, C5L2. *Journal of Biological Chemistry* 280, 39677-39680.

Gether, U., and Kobilka, B.K. (1998). G protein-coupled receptors - II. Mechanism of agonist activation. *Journal of Biological Chemistry* 273, 17979-17982.

Gillis, S., and Watson, J. (1980). Biochemical and Biological Characterization of Lymphocyte Regulatory Molecules .5. Identification of an Interleukin 2-Producing Human-Leukemia T-Cell Line. *Journal of Experimental Medicine* 152, 1709-1719.

Golovtchenko, A.M., and Raichvarg, D. (1975). Lymphocytes - Role in Cellular and Humoral Immunity. *Annales De Biologie Clinique* 33, 63-74.

Goodman, M.G., Chenoweth, D.E., and Weigle, W.O. (1982). Induction of Interleukin-1 Secretion and Enhancement of Humoral Immunity by Binding of Human C5a to Macrophage Surface C5a Receptors. *Journal of Experimental Medicine* 156, 912-917.

Gross, J.A., Callas, E., and Allison, J.P. (1992). Identification and Distribution of the Costimulatory Receptor Cd28 in the Mouse. *Journal of Immunology* 149, 380-388.

Harding, C.V. (1993). Cellular and Molecular Aspects of Antigen-Processing and the Function of Class-II Mhc Molecules. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 8, 461-467.

Hawlish, H., Wills-Karp, M., Karp, C.L., and Kohl, J. (2004). The anaphylatoxins bridge innate and adaptive immune responses in allergic asthma. *Molecular Immunology* 41, 123-131.

Hook, W.A., Siraganian, R.P., and Wahl, S.M. (1975). Complement-Induced Histamine-Release from Human Basophils .1. Generation of Activity in Human-Serum. *Journal of Immunology* 114, 1185-1190.

Huxford, T. Structural Biochemistry Laboratory; NF-kappa B, <http://www-rohan.sdsu.edu/~thuxford/Research.html>.

Ibelgauf, H. (2007). Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia, <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>

Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, N., Kawasaki, T., and Yamashina, I. (1987). Serum Lectin with Known Structure Activates Complement through the Classical Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 262, 7451-7454.

INVITROGEN (2005). Cloned AMV, first stand synthesis kit, http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/clonedamv_kit_pps.pdf.

INVITROGEN (2007). Luminex® Extracellular Assay Protocol, Biosource (Invitrogen cytokine& signaling), <http://www.invitrogen.com/downloads/Luminex%20Extracellular%20Protocol.pdf>.

Jiang, H.P., Kuang, Y.N., Wu, Y.P., Smrcka, A., Simon, M.I., and Wu, D.Q. (1996). Pertussis toxin-sensitive activation of phospholipase C by the C5a and fMet-Leu-Phe receptors. *Journal of Biological Chemistry* 271, 13430-13434.

Johnson, G.L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.

Karin, M. (1995). The Regulation of AP-1 Activity by Mitogen-activated Protein Kinases. *Journal of Biological Chemistry* 270, 16483-16486.

Karin, M., and Delhase, M. (2000). The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Seminars in Immunology* 12, 85-98.

Karin, M., and Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Current Biology* 5, 747-757.

- Katz, D.H., Hamaoka, T., Dorf, M.E., and Benacerr.B (1973). Cell Interactions between Histoincompatible-T and B-Lymphocytes - H-2 Gene Complex Determines Successful Physiologic Lymphocyte Interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, 2624-2628.
- Kay, A.B., Shin, H.S., and Austen, K.F. (1973). Selective Attraction of Eosinophils and Synergism between Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis (Ecf-a) and a Fragment Cleaved from Fifth Component of Complement (C5a). *Immunology* 24, 969-976.
- Kemper, C., and Atkinson, J.P. (2007). T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 7, 9-18.
- Klos, A., Bank, S., Gietz, C., Bautsch, W., Kohl, J., Burg, M., and Kretzschmar, T. (1992). C3a Receptor on Dibutyl-Camp-Differentiated U937 Cells and Human Neutrophils - the Human C3a Receptor Characterized by Functional-Responses and I-125 C3a Binding. *Biochemistry* 31, 11274-11282.
- Kumar, S., Boehm, J., and Lee, J.C. (2003). p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2, 717-726.
- Lachmann, P.J., and Hughesjones, N.C. (1984). Initiation of Complement Activation. *Springer Seminars in Immunopathology* 7, 143-162.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227, 680-&.
- Laskin, D.L., and Pilaro, A.M. (1986). Potential Role of Activated Macrophages in Acetaminophen Hepatotoxicity .1. Isolation and Characterization of Activated Macrophages from Rat-Liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* 86, 204-215.
- Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker*, 3 edn (Oslo, Norge, Fagbokforlaget).
- Lee, D.K., George, S.R., Cheng, R., Nguyen, T., Liu, Y., Brown, M., Lynch, K.R., and O'Dowd, B.F. (2001). Identification of four novel human G protein-coupled receptors expressed in the brain. *Molecular Brain Research* 86, 13-22.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual Review of Immunology* 14, 233-258.
- Lewin, B. (2004). *Genes VIII*.
- Linsley, P.S., Clark, E.A., and Ledbetter, J.A. (1990). T-Cell Antigen Cd28 Mediates Adhesion with B-Cells by Interacting with Activation Antigen B7/Bb-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 5031-5035.
- Matsumoto, M.L., Narzinski, K., Nikiforovich, G.V., and Baranski, T.J. (2007). A comprehensive structure-function map of the intracellular surface of the human C5a receptor

- II. Elucidation of G protein specificity determinants. *Journal of Biological Chemistry* 282, 3122-3133.

McCarthy, K., and Henson, P.M. (1979). Induction of Lysosomal Enzyme-Secretion by Alveolar Macrophages in Response to the Purified Complement Fragments C5a and C5a Des-Arg. *Journal of Immunology* 123, 2511-2517.

MedscapeToday (2003). <http://www.medscape.com/content/2003/00/45/36/453656/art-nm453656.fig5.jpg>.

Monk, P.N., Scola, A.M., Madala, P., and Fairlie, D.P. (2007). Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol* 152, 429-448.

Monsinjon, T., Gasque, P., Chan, P., Ischenko, A., Brady, J.J., and Fontaine, M. (2003). Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. *Faseb Journal* 17, 1003-1014.

Morris, P.J., Vaughan, H., Tait, B.D., and Mackay, I.R. (1977). Histocompatibility Antigens (Hla) - Associations with Immunopathic Diseases and with Responses to Microbial Antigens. *Australian and New Zealand Journal of Medicine* 7, 616-624.

Nataf, S., Davoust, N., Ames, R.S., and Barnum, S.R. (1999). Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. *Journal of Immunology* 162, 4018-4023.

Nieto, M.A., Gonzalez, A., Lopezrivas, A., Diazespada, F., and Gambon, F. (1990). IL-2 Protects against Anti-Cd3-Induced Cell-Death in Human Medullary Thymocytes. *Journal of Immunology* 145, 1364-1368.

Norgauer, J., Dobos, G., Kownatzki, E., Dahinden, C., Burger, R., Kupper, R., and Gierschik, P. (1993). Complement Fragment C3a Stimulates Ca²⁺ Influx in Neutrophils Via a Pertussis-Toxin-Sensitive G-Protein. *European Journal of Biochemistry* 217, 289-294.

O'Barr, S.A., Caguioa, J., Gruol, D., Perkins, G., Ember, J.A., Hugli, T., and Cooper, N.R. (2001). Neuronal expression of a functional receptor for the C5a complement activation fragment. *Journal of Immunology* 166, 4154-4162.

Ohno, M., Hirata, T., Enomoto, M., Araki, T., Ishimaru, H., and Takahashi, T.A. (2000). A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Molecular Immunology* 37, 407-412.

Okinaga, S., Slattery, D., Humbles, A., Zsengeller, Z., Morteau, O., Kinrade, M.B., Brodbeck, R.M., Krause, J.E., Choe, H.R., Gerard, N.P., *et al.* (2003). C5L2, a nonsignaling C5A binding protein. *Biochemistry* 42, 9406-9415.

Okusawa, S., Dinarello, C.A., Yancey, K.B., Endres, S., Lawley, T.J., Frank, M.M., Burke, J.F., and Gelfand, J.A. (1987). C5a Induction of Human Interleukin-1 - Synergistic Effect with Endotoxin or Interferon-Gamma. *Journal of Immunology* 139, 2635-2640.

Okusawa, S., Yancey, K.B., Vandermeer, J.W.M., Endres, S., Lonnemann, G., Hefter, K., Frank, M.M., Burke, J.F., Dinarello, C.A., and Gelfand, J.A. (1988). C5a Stimulates Secretion of Tumor Necrosis Factor from Human Mononuclear-Cells Invitro - Comparison with Secretion of Interleukin-1-Beta and Interleukin-1-Alpha. *Journal of Experimental Medicine* 168, 443-448.

Otto, M., Hawlisch, H., Monk, P.N., Muller, M., Klos, A., Karp, C.L., and Kohl, J. (2004). C5a mutants are potent antagonists of the C5a receptor (CD88) and of C5L2 - Position 69 is the locus that determines agonism or antagonism. *Journal of Biological Chemistry* 279, 142-151.

Pamer, E., and Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I - Restricted antigen processing. *Annual Review of Immunology* 16, 323-358.

Pan, Z.X.K. (1998). Anaphylatoxins C5a and C3a induce nuclear factor kappa B activation in human peripheral blood monocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* 1443, 90-98.

Pearson, G. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.

Pfizenmaier, K., Rollinghoff, M., and Wagner, H. (1982). Functional-Analysis of Il-2 Produced by T-Cell-Hybridomas - Il-2 Promotes T-Cell Growth but Does Not Mediate T-Cell or B-Cell Maturation and Differentiation. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 100, 203-209.

QIAGEN (2006). Rneasy@MiniKit,
<http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000291>.

Ramstad, C., Sundvold, V., Johansen, H.K., and Lea, T. (2000). cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibits T cell activation by phosphorylating Ser-43 of Raf-1 in the MAPK/ERK pathway. *Cellular Signalling* 12, 557-563.

Riedemann, N.C., Guo, R.F., Hollmann, T.J., Gao, H.W., Neff, T.A., Reuben, J.S., Speyer, C.L., Sarma, J.V., Wetsel, R.A., Zetoune, F.S., *et al.* (2003). Regulatory role of C5a in LPS-induced IL-6 production by neutrophils during sepsis. *Faseb Journal* 17, 370-+.

Roglic, A., Prossnitz, E.R., Cavanagh, S.L., Pan, Z.X., Zou, A.H., and Ye, R.D. (1996). cDNA cloning of a novel G protein-coupled receptor with a large extracellular loop structure. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* 1305, 39-43.

Rollins, T.E., Siciliano, S., Kobayashi, S., Cianciarulo, D.N., Bonillaargudo, V., Collier, K., and Springer, M.S. (1991). Purification of the Active C5a Receptor from Human Polymorphonuclear Leukocytes as a Receptor-Gi Complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 971-975.

Samelson, L.E., Harford, J.B., and Klausner, R.D. (1985). Identification of the Components of the Murine T-Cell Antigen Receptor Complex. *Cell* 43, 223-231.

- Saxena, M., Williams, S., Gilman, J., and Mustelin, T. (1998). Negative Regulation of T Cell Antigen Receptor Signal Transduction by Hematopoietic Tyrosine Phosphatase (HePTP). *Journal of Biological Chemistry* 273, 15340-15344.
- Sayah, S., Jauneau, A.C., Patte, C., Tonon, M.C., Vaudry, H., and Fontaine, M. (2003). Two different transduction pathways are activated by C3a and C5a anaphylatoxins on astrocytes. *Molecular Brain Research* 112, 53-60.
- Schindler, R., Gelfand, J.A., and Dinarello, C.A. (1990). Recombinant C5a Stimulates Transcription Rather Than Translation of Interleukin-1 (Il-1) and Tumor-Necrosis-Factor - Translational Signal Provided by Lipopolysaccharide or Il-1 Itself. *Blood* 76, 1631-1638.
- Schraufstatter, I.U., Trieu, K., Sikora, L., Sriramaraio, P., and DiScipio, R. (2002). Complement C3a and C5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells. *Journal of Immunology* 169, 2102-2110.
- Schwab, R., Weksler, M.E., and Russo, C. (1988). Cd3 Pathway of T-Cell Activation .2. Role of Hla-Class-I Molecules in Early Events. *Cellular Immunology* 115, 310-324.
- Secko, D. (2003). CONVERSING AT THE CELLULAR LEVEL: AN INTRODUCTION TO SIGNAL TRANSDUCTION, <http://www.scq.ubc.ca/conversing-at-the-cellular-level-an-introduction-to-signal-transduction/> (The Science Creative Quarterly).
- Shum, J.K., Allen, R.A., and Wong, Y.H. (1995). The Human Chemoattractant Complement C5a Receptor Inhibits Cyclic-Amp Accumulation through G(I) and G(Z) Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 208, 223-229.
- Siebenlist, U., Franzoso, G., and Brown, K. (1994). Structure, Regulation and Function of Nf-Kappa-B. *Annual Review of Cell Biology* 10, 405-455.
- Snyderma, R., Shin, H.S., and Hausman, M.S. (1971). C5a - Chemotactic Factor for Mononuclear Leukocytes. *Journal of Immunology* 107, 316-&.
- Strey, C.W., Markiewski, M., Mastellos, D., Tudoran, R., Spruce, L.A., Greenbaum, L.E., and Lambris, J.D. (2003). The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *Journal of Experimental Medicine* 198, 913-923.
- Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M., and Benneriah, Y. (1994). Jnk Is Involved in Signal Integration During Costimulation of T-Lymphocytes. *Cell* 77, 727-736.
- Su, B., and Karin, M. (1996). Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Current Opinion in Immunology* 8, 402-411.
- Symington, F.W., and Teh, H.S. (1980). A 2-Signal Mechanism for the Induction of Cytotoxic Lymphocytes-T. *Scandinavian Journal of Immunology* 12, 1-12.
- Taniguchi, T., and Minami, Y. (1993). The Il-2/Il-2 Receptor System - a Current Overview. *Cell* 73, 5-8.

- Vignali, D.A.A. (2000). Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *Journal of Immunological Methods* 243, 243-255.
- Ward, P.A. (2004). The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol* 4, 133-142.
- Werfel, T., Kirchhoff, K., Wittmann, M., Begemann, G., Kapp, A., Heidenreich, F., Gotze, O., and Zwirner, J. (2000). Activated human T lymphocytes express a functional C3a receptor. *Journal of Immunology* 165, 6599-6605.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews* 79, 143-180.
- Yang, J.H., New, L., Jiang, Y., Han, J.H., and Su, B. (1998). Molecular cloning and characterization of a human protein kinase that specifically activates c-Jun N-terminal kinase. *Gene* 212, 95-102.
- Yao, J., Harvath, L., Gilbert, D.L., and Colton, C.A. (1990). Chemotaxis by a Cns Macrophage, the Microglia. *Journal of Neuroscience Research* 27, 36-42.
- York, I.A., and Rock, K.L. (1996). Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annual Review of Immunology* 14, 369-396.
- Zhang, W.G., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P., and Samelson, L.E. (1998). LAT: The ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92, 83-92.
- Zhang, X.L., Boyar, W., Toth, M.J., Wennogle, L., and Gonnella, N.C. (1997). Structural definition of the C5a C terminus by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Proteins-Structure Function and Genetics* 28, 261-267.
- Zuiderweg, E.R.P., and Fesik, S.W. (1989). Heteronuclear 3-Dimensional Nmr-Spectroscopy of the Inflammatory Protein C5a. *Biochemistry* 28, 2387-2391.
- Zuiderweg, E.R.P., Nettesheim, D.G., Mollison, K.W., and Carter, G.W. (1989). Tertiary Structure of Human-Complement Component C5a in Solution from Nuclear Magnetic-Resonance Data. *Biochemistry* 28, 172-185.